



TESIS DOCTORAL

**INFLUENCIA DE LA VARIEDAD, RÉGIMEN HÍDRICO, ESTADO
DE MADURACIÓN Y AÑO DE COSECHA EN EL EQUILIBRIO
ENTRE ACTIVIDADES OXIDANTES-ANTIOXIDANTES DE LA
ACEITUNA MEDIANTE ANÁLISIS POR MDS-PTA**

Juan Antonio Sainz Domínguez

**R004 - PROGRAMA DE DOCTORADO EN BIOLOGÍA MOLECULAR Y
CELULAR, BIOMEDICINA Y BIOTECNOLOGÍA**

Año 2020

Con la conformidad de los Directores:

Francisco Espinosa Ovejero

Inmaculada Garrido Carballo

Marcos Hernández Suárez

*Dedicado a mis padres, sin los cuales este trabajo hubiera sido COMPLETAMENTE imposible.
Gracias por la paciencia, el ánimo, la tenacidad y el ejemplo.*

*Agradezco también su inmensa ayuda al Departamento de Fisiología Vegetal de la UEX, por el
seguimiento, consejo, revisión y constante apoyo.*

Resumen

La composición y el contenido fenólico de la aceituna son algunos de los atributos que determinan la calidad del aceite y están sujetos al equilibrio entre actividades oxidantes-antioxidantes. Esta composición depende de la variedad de aceituna, el sistema de cultivo y del grado de maduración de la aceituna. En esta tesis doctoral se han estudiado dos variedades de olivo (Manzanilla y Morisca), bajo dos regímenes hídricos (secano y regadío), cosechados en tres estados de maduración (S1, S2 y S3), y en tres campañas consecutivas (2011, 2012 y 2013). Se encontró que la acumulación de fenoles en la fruta dependía solo del estado de maduración, mientras que los contenidos de flavonoides y fenilpropanoides dependían también de la variedad y el régimen hídrico. La actividad de la superóxido dismutasa (SOD) se vinculó a la producción de O_2^- , que a su vez dependía del régimen hídrico, la variedad y el estado de maduración (este último es un proceso que involucra ROS). La actividad de la peroxidasa (POX) parecía depender solo de la maduración, mientras que la actividad de la polifenol oxidasa (PPO) varió de un año a otro, además de presentar una fuerte dependencia de la maduración, lo que es coherente con los niveles de compuestos fenólicos que acumulan las aceitunas. Todas estas relaciones entre variables y factores conforman un conjunto de datos estructurado como una matriz multidimensional que es difícil de interpretar utilizando técnicas convencionales de análisis estadístico. En esta tesis doctoral, se ha realizado un enfoque novedoso (escalamiento multidimensional asociado con un análisis triádico parcial, MDS-PTA) para el análisis de este tipo de estructura de datos, que permite su correcta interpretación. El análisis mostró que el estado de maduración de las aceitunas es el factor más claramente discriminatorio, mucho más que la variedad, el régimen hídrico o el año. Por tanto, los fenoles y la actividad antioxidante total (FRAP) mostraron una fuerte agrupación, que está estrechamente relacionada en los tres años estudiados. Las actividades oxidantes y antioxidantes mostraron cierta tendencia a agruparse, aunque en estos casos el año también tuvo una influencia como factor, lo que indica que estos parámetros dependen más de factores externos y menos de madurez.

Abstract

The phenolic composition and content of olive fruit are some of the attributes that determine oil quality, and be subject to the oxidative-antioxidative balance. This composition depends on the olive variety, the cultivation system, and the fruit's ripeness. This doctoral thesis considered two olive varieties (Manzanilla and Morisca), under two water regimes (irrigated and rainfed), harvested at three stages of maturation (S1, S2, and S3), over three consecutive campaigns (2011, 2012, and 2013). The accumulation of phenols in the fruit was found to depend only on the stage of ripeness, while the flavonoid and phenylpropanoid contents depended also on the variety and the water regime. Superoxide dismutase (SOD) activity was linked to O_2^- production, which in turn depended on water regime, variety, and stage of maturation (this last being a process involving ROS). The peroxidase (POX) activity seemed only to depend on ripeness, while polyphenol oxidase (PPO) activity varied from year to year as well as presenting a strong ripeness dependence that was in clear coherence with the levels of phenolic compounds that the olives accumulate. All these relationships between the variables and the factors conform a dataset structured as a multidimensional array that is difficult to interpret using conventional techniques of statistical analysis. In this doctoral thesis, a novel approach (MultiDimensional Scaling associated with a Partial Triadic Analysis, MDS-PTA) to the analysis of this type of data structure has been performed, which allows its correct interpretation. The analysis showed that the state of maturation of the olives is the most clearly discriminating factor, far more so than the cultivar, water regime, or year. Thus, the phenols and the total antioxidant activity (FRAP) showed strong clustering, being closely related in all three years studied. The oxidant and antioxidant activities showed a certain tendency to cluster, although in these cases the year also had an influence as a factor, indicating that these parameters depend more on external factors and less on ripeness.

Introducción

1.- El olivo

1.1.- Origen del olivo

El cultivo del olivo (*Olea europaea* L.), se ha desarrollado en la ribera mediterránea desde la antigüedad, estimándose su origen en la última glaciación (75.000-10.000 a.C.), donde se cree que ejemplares de esta especie sobrevivieron al cuaternario en los refugios glaciales del sur de Europa (Carrión et al., 2010). Algunos investigadores han determinado la existencia de tres cepas originales: África del Sur, Asia y cuenca Mediterránea, siendo una mezcla de estas tres variedades, la que daría lugar a las formas cultivadas del olivo. Según varios estudios arqueológicos y genéticos, el olivo cultivable fue probablemente producto de la domesticación de su progenitor silvestre, el acebuche (*O. europaea* ssp. *europaea* var. *Sylvestris*), hace aproximadamente 6000 años en Oriente Medio, probablemente cerca de la frontera entre Turquía y Siria (Zohary y Spiegel-Roy, 1975; Besnard et al., 2013). Pese a las evidencias del cultivo del olivo en la Edad del Bronce, la existencia del aceite de oliva en esa época, y su objetivo exacto no es conocido (Riley, 2002).

Más allá de estas investigaciones, existe constancia de su cultivo para la obtención de aceite ya en el paleolítico y el neolítico (5.000 a 3.500 a.C). (Polese, 2009), y su procedencia se ha determinado en las costas de Siria, Líbano e Israel y, en menor medida, Asia menor. Más adelante, entraremos en el detalle sobre las diferentes teorías respecto al origen del cultivo del olivo, basándonos en los análisis genéticos y teorías sobre los procesos de domesticación.

Numerosos investigadores han cuestionado los orígenes del olivo, en función de las poblaciones actuales de olivos silvestres. La patria del olivo silvestre, según los estudios de los primeros autores que profundizaron en este tema, es Anatolia, donde estos olivos forman densas arboledas, y se extendió a Siria y Grecia a través de Anatolia (De Candolle, 1886). La flora de la cuenca del Mediterráneo se divide en dos mitades, oriental y occidental, divididas por la cuenca de la Cirenaica, en Libia, y el mar

Adriático (Blondel et al., 2010; Rodríguez-Ariza y Montes, 2005; Terral et al., 2012; Breton et al., 2009).

En la actualidad, la distribución geográfica del acebuche desde la última edad de hielo no ha cambiado; ha desaparecido de los agro-ecosistemas, principalmente debido al enorme desarrollo agrícola del olivo cultivado en los últimos siglos, pero no ha disminuido en los ecosistemas naturales, lo cual la excluye de ser una especie en peligro de extinción (Hannachi et al., 2010). El acebuche se distribuye a lo largo de la costa mediterránea. Es autóctono en España, Francia (continental y Córcega), Cerdeña, Italia (continental y las islas de Sicilia), Grecia y Turquía con la isla de Chipre, y en todos los países del Mediterráneo oriental y meridional (Jordania, Líbano, Siria, Israel, Egipto, Libia (Sinaí), Túnez, Argelia y Marruecos. Su dispersión actual está, en gran medida, unida a la preservación de los ejemplares silvestres que sobrevivieron después de la última edad de hielo en las poblaciones resguardadas que sirvieron de refugio, como hemos mencionado anteriormente. La información de que disponemos sobre su propagación durante el Pleistoceno tardío se basa en muestras fósiles de polen y carbón de madera (Blondel y Aronson, 1995; Figueiral y Terral, 2002; Carrión et al. 2010; Tzedakis et al. 2002), muestras que manifiestan su presencia temprana en el Mediterráneo occidental, principalmente en el Levante español. Durante el Holoceno es notorio que se propagó rápidamente y se convirtió en una especie abundante o incluso dominante (Carrión et al. 2010). Al analizarse características botánicas para identificar la posible asociación entre el acebuche y otros árboles termófilos de la zona de clima mediterráneo, en comparación con los de la costa atlántica, se pudieron definir zonas donde el olivo tendería a prosperar, estando claramente favorecidas aquellas con clima mediterráneo.

El olivo es, en definitiva, el árbol más emblemático de las regiones mediterráneas. Junto con el cultivo de vid y cereales, representa la actividad agrícola más tradicional y la característica más llamativa de su paisaje agrícola (Angles, 1999). Las zonas de cultivo más favorables se encuentran en laderas o tierras irregulares (Romero, 1998), por lo que el olivo ocupa zonas significativas de las montañas y colinas de nuestro entorno. En estas regiones es habitual transformar el hostil bajo relieve del suelo mediante el uso de terrazas en tierras productivas, lo que revela la fortaleza de

la vida en el Mediterráneo y la resistencia de los cultivadores que se esfuerzan por conquistar nuevos terrenos de cultivo. En estas terrazas se encuentran los olivares, viñedos y cítricos, aunque, por extensión y dimensión, el olivo es mayoritario. En el Mediterráneo se forma así un paisaje rural diferenciado, que diferencia la zona de Europa central y septentrional con las tierras de cultivo de la cuenca meridional (Lebeau, 1991).

1.2.. Migración histórica del olivo

La historia de la migración del cultivo del olivo es particularmente compleja, con la participación de los fenicios, griegos y romanos, que ampliaron este cultivo, de este a oeste, y a través de las costas norte y sur de la Cuenca Mediterránea (Zohary y Spiegel-Roy, 1975; Kaniewski et al., 2012).

La mayoría de los investigadores atribuyen su llegada a Europa a los fenicios, que, en sus rutas comerciales, propagaron su cultivo en Chipre, Creta, e Islas del Mar Egeo, pasando a Grecia continental y más tarde a Sicilia y a Italia continental. Los primeros indicios de la presencia del olivo en las costas mediterráneas españolas aparecen igualmente durante la dominación marítima de los fenicios (1050 a. C), que también aportaron el procedimiento para obtener el aceite; pero alcanzó un enorme desarrollo con el dominio de Roma (45 a. C). Posteriormente, los árabes introdujeron sus variedades en el sur de España e influyeron en la difusión del cultivo, convirtiendo a España en el primer país productor de aceite de oliva a nivel mundial, y dejando una imborrable huella cultural, como demuestra el hecho de que muchos vocablos castellanos, como aceite (“az-zait”), aceituna o acebuche tienen raíz árabe.

El olivo es considerado uno de los mejores indicadores biológicos del clima mediterráneo (Blondel et al., 2010). La domesticación del olivo, caracterizada por la propagación vegetativa de los mejores genotipos cultivados, comenzó en el Cercano Oriente hace aproximadamente 6000 años. Sin embargo, varios estudios genéticos han apoyado múltiples orígenes de cultivares en el área mediterránea (Belaj et al., 2010; Besnard et al., 2001; Baldoni et al. 2006; Besnard et al., 2007; Breton et al., 2009; Belaj

et al., 2012), pero no está claro si esto refleja una diversificación secundaria o múltiples eventos primarios independientes. Además, se ha cuestionado la existencia, o no, de un centro de domesticación original en el Cercano Oriente, ya que las poblaciones del olivo silvestre del Mediterráneo oriental tienen una diversidad genética baja en comparación con las del área occidental (Lumaret y Ouazzani, 2001). Los patrones genéticos actuales también podrían, y deberían, interpretarse a la luz de registros paleoclimáticos, fósiles y subfósiles.

El olivo contribuye en la conformación de los paisajes y tiene una profunda importancia en la agroeconomía, incluidas las economías industriales basadas en sus productos. Sin embargo, el olivo silvestre prospera en la mayor parte de las zonas de cultivo del olivo domesticado, contribuyendo de forma significativa a la conformación del paisaje, pero de una forma mucho menor a la agroeconomía.

Proporcionalmente, el área donde prospera el olivo silvestre es limitada en comparación con la zona donde el olivo es cultivado. De hecho, esta es una de las consecuencias de los 7.000 a 8.000 años de domesticación, con el claro objetivo de extender y colonizar nuevos hábitats donde cultivar el olivo, más allá de la esfera biológica del olivo silvestre. De hecho, la historia de la domesticación del olivo está estrechamente vinculada a la humanidad y su tendencia a colonizar todos los ambientes, incluso los más hostiles (Figueiral y Terral, 2002; Hannachi et al., 2010; Rubio et al., 2002; Breton et al., 2012).

El cultivo del olivo sale de la cuenca mediterránea con el descubrimiento de América, en 1492. En tiempos más modernos el olivo ha continuado su expansión más allá del Mediterráneo, cultivándose hoy en lugares tan alejados de su origen como la región sudafricana, Australia, Japón o China (figura 1). El olivo fue introducido en el Nuevo Mundo desde América del Sur por los españoles (exploradores y monjes) a principios del siglo XVI (comenzando por Colombia y Perú, y más tarde en la costa oeste de los EE.UU.). La historia de los olivos en California está claramente vinculada a las misiones españolas, también presentes, aunque no con el mismo impacto, principalmente por factores climáticos, en el Caribe y México central (Soleri et al., 2007; Taylor, 1997). También fue introducido en Sudáfrica después de la colonización

Boer, y allí coexiste con la subespecie *cuspidata*. En Australia el olivo fue introducido en 1812 (Breton et al., 2008), y más tarde otros cultivares fueron introducidos en China, Japón, Argentina y Chile, todos los países con abundantes zonas con clima mediterráneo.



Figura 1. Distribución actual del olivar en el mundo. <http://deoleo.com/aceite-de-oliva/el-olivo/suelo-y-clima/>.

Actualmente, los principales productores mundiales de aceitunas son España, Italia y Grecia (Vossen, 2007), aunque existe un considerable crecimiento de su cultivo en Argentina, Australia, Chile, China y los Estados Unidos (FAO, 2012).

1.3.- Domesticación del olivo

La domesticación de una especie vegetal se basa en el comportamiento consciente de los seres humanos para seleccionar, de entre la diversidad natural de una especie, aquellos individuos que satisfacen las necesidades humanas (Zeder et al., 2006) como en el rendimiento (de semillas u otros órganos), la composición (azúcar, almidón, grasas, ...), y la facilidad para el mantenimiento del cultivo (latencia de las semillas, etc.). Estas prácticas humanas han tenido efectos sobre el genoma de la planta, efectos que están ampliamente documentados para muchas especies de cultivo, especialmente cereales, cebada, maíz o girasol. Los botánicos han deducido que el olivo puede haber seguido una historia similar.

Como se ha comentado anteriormente, la domesticación de las diferentes especies animales y vegetales ha sido un paso esencial en el surgimiento y auge de la cultura mediterránea, pero postular teorías sobre la historia de las diversas domesticaciones es un reto complejo (Diamond, 2002). Los eventos de domesticación comenzaron hace varios milenios, y su seguimiento se hace difícil al no disponerse, en muchos casos, de registros al respecto. Aún lo hace más complicado la dispersión a largas distancias mediada por el ser humano, y los cruces recurrentes entre cultivares y formas silvestres. De entre los cultivos tradicionales de la cuenca mediterránea, el olivo es la especie más emblemática debido a su importancia ecológica, económica y cultural (Zohary et al., 2012; Carrión et al., 2010; Kaniewski et al., 2012).

Todos los datos sobre los ejemplares de olivo silvestre pueden analizarse utilizando:

- Muestras botánicas para buscar claves para una clasificación diferencial,
- Registros de similitud para intentar establecer diferencias estadísticas, y
- Relaciones genéticas usando métodos bayesianos.

Ya que la diferenciación entre los olivo silvestres y cultivados no revela rasgos clave, ni morfológicos, ni moleculares (Lumaret y Ouazzani, 2001; Besnard et al., 2001; Rubio et al., 2002), se ha recurrido a registros de similitud para establecer diferencias entre ambos. Estos registros han demostrado una separación clara, aunque algunos árboles no resultaron agrupados, lo que puede indicar que existen formas híbridas entre los dos grupos de árboles.

Para entender el proceso de domesticación, es necesario el análisis genético de muestras de diferentes localizaciones. Por ello, es importante conocer la base que justifica los métodos de análisis más comunes. La evolución de los métodos para obtener y analizar los datos moleculares es permanente, debido al enorme progreso en el desarrollo de nuevas técnicas. Los progresos en el desarrollo de marcadores moleculares en los últimos veinte años han hecho que algunas técnicas más antiguas se conviertan en caducas (Breton et al., 2009 ; Breton, 2006). Independientemente de las técnicas utilizadas para visualizar la diversidad genética, la principal característica

es que los datos se obtienen principalmente de los tres soportes de ADN en el olivo: el ADN mitocondrial (mt-), el ADN de cloroplasto (cp-), y el ADN nuclear (nu-) (Mariotti et al., 2010; Bronzini de Caraffa et al., 2002; Erre et al, 2010). La información que se extrae de estos tres tipos de ADN tiene interés por los mecanismos de herencia y por su modo de evolución. El mt-ADN se hereda maternalmente, como el cp-ADN (Besnard et al., 2000), y evoluciona o bien por recombinación, o por mutación y delección, respectivamente. Todos los métodos utilizados para estructurar la diversidad genética se basan en las frecuencias alélicas que son consistentes con marcadores codominantes, calculándose mediante correspondencia y análisis jerárquico (generando dendrogramas). Aproximadamente desde el año 2000, se han utilizado métodos bayesianos para estudiar el ADN nuclear (nu-ADN), con la intención de analizar los conjuntos de datos y constituir clústeres (basado en inferencias de frecuencias alélicas) (Pritchard et al., 2000). Estos clústeres normalmente nos pueden ayudar a identificar orígenes comunes en diferentes individuos. Sin embargo, el propio uso de métodos bayesianos puede mezclar datos de nu-, y cp- o mt-ADN. Pese a que estos métodos han permitido atisbar el origen del olivo, su mayor aportación es abrir el camino a métodos más adecuados (Breton y Bervillé, 2009). Obviamente, el conjunto de datos antiguos podrían ser tratados de nuevo con los nuevos métodos para obtener nueva información.

Existe cierto consenso en cuanto a la existencia de tres grupos genéticos de variedades del olivo, denominadas por varios investigadores como Q1, Q2 y Q3, junto con un grupo más complejo, llamado mosaico (Haouane et al., 2011; Díez et al 2012; El Bakkali et al., 2013). El grupo Q1 representa la mayor parte de los cultivares en el sur de España, y está estrechamente relacionado con una variedad silvestre supuestamente procedente de Israel. Por otro lado, el grupo Q2 se encuentra principalmente en la Cuenca Mediterránea central, y contiene contribuciones genéticas apreciables de olivo silvestre originario del Levante español y Cerdeña. El grupo Q3 es el considerado original, que tiene mayor prevalencia en Oriente Medio. Por último, los cultivares de mosaico representan un grupo heterogéneo que puede ser indicativo de la mezcla reciente entre los distintos grupos de cultivares (Díez et al., 2015).

En otros estudios semejantes, se revisaron los diferentes polimorfismos en el genoma plastídico (ptDNA) de 1797 árboles, lo que permitió la identificación de 48 perfiles distintos que delineaban tres linajes divergentes: E1, E2 y E3 (los que podrían ser equivalentes a los anteriormente mencionados Q1, Q2 y Q3). Se encontró una mayor diversidad en los olivos silvestres que en los ejemplares cultivados. En cuanto a la distribución por linajes, se observó que los linajes E2 y E3 se encontraban exclusivamente en las zonas del Mediterráneo occidental y central, mientras que el linaje E1 se distribuye actualmente en toda la cuenca (figura 2) (Besnard et al., 2013).

Profundizando en las diferentes teorías de cómo se produjo el proceso de domesticación de las especies silvestres del olivo, y de cómo se inició la oleicultura, ya se ha destacado anteriormente que se han observado diferencias entre las variedades del Mediterráneo central europeo respecto a los extremos orientales y occidentales. Estas diferencias entre variedades sugieren que los procesos de domesticación fueron diferentes en el área que abarca el Levante español, Baleares, Cerdeña y el sur de la Italia peninsular y Grecia que en el resto del Mediterráneo. En varios estudios se observa que existen diferentes patrones genéticos en las variedades de olivo, teniendo, como mencionamos previamente, su centro de domesticación principal en Oriente Próximo, que fue el que, probablemente, se extendió por toda la cuenca mediterránea.

Sin embargo, en el centro de la cuenca se observa que hay particularidades propias, caracterizadas por un mayor cruce con los acebuches locales. De hecho, revisando el Banco de Germoplasma Mundial del Olivo, se ha encontrado que las muestras procedentes de Oriente Próximo se parecían más a las del sur de España y Marruecos que a las de la zona central del Mediterráneo (figuras 3 y 4). Probablemente esta sea la consecuencia de la ocupación islámica en estas zonas, mientras que las variedades del centro del Mediterráneo tenían mayor relación con los cultivares característicos de la Corona de Aragón. Además, las muestras presentes en América, llevadas por los conquistadores, se parecían más a las del sur que a las del este de España (Díez et al., 2015).

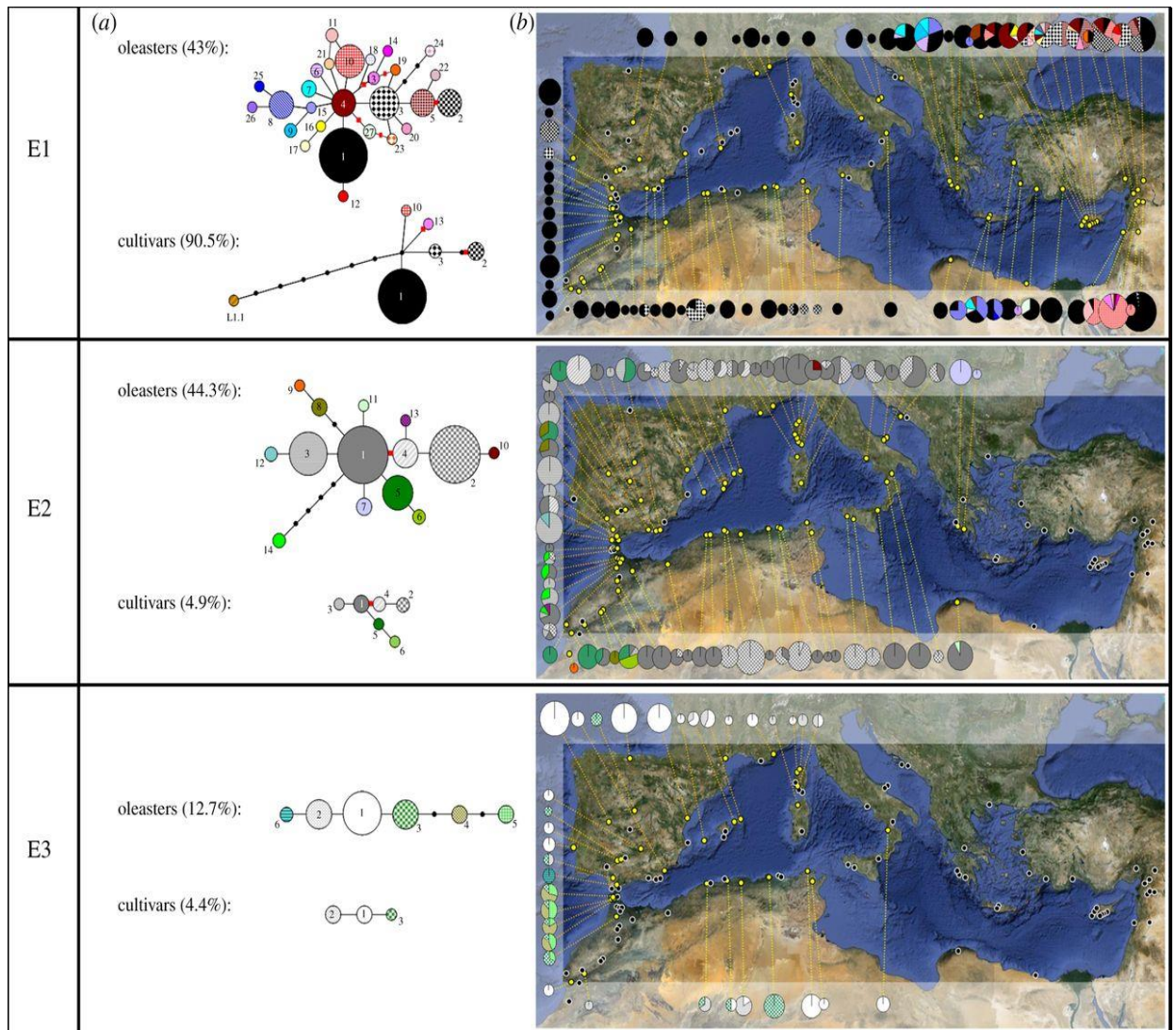


Figura 2. Diversidad de los tres linajes mediterráneos de olivos desde el punto de vista genético (Besnard et al., 2013). En **a)**, descripción de las redes de haplotipos para cada linaje y para los grupos de genes silvestres y cultivados. Cada haplotipo está numerado y representado por un símbolo con un color determinado, siendo las frecuencias del haplotipo proporcionales al diámetro de los símbolos. Los nodos intermedios de datos inexistentes se indican mediante pequeños puntos negros. La frecuencia de cada linaje de olivo silvestres y cultivares se indica entre paréntesis. En **b)**, distribución geográfica de los haplotipos en las poblaciones de olivo silvestre. El tamaño de los gráficos circulares es relativo al número de árboles analizados por ubicación.

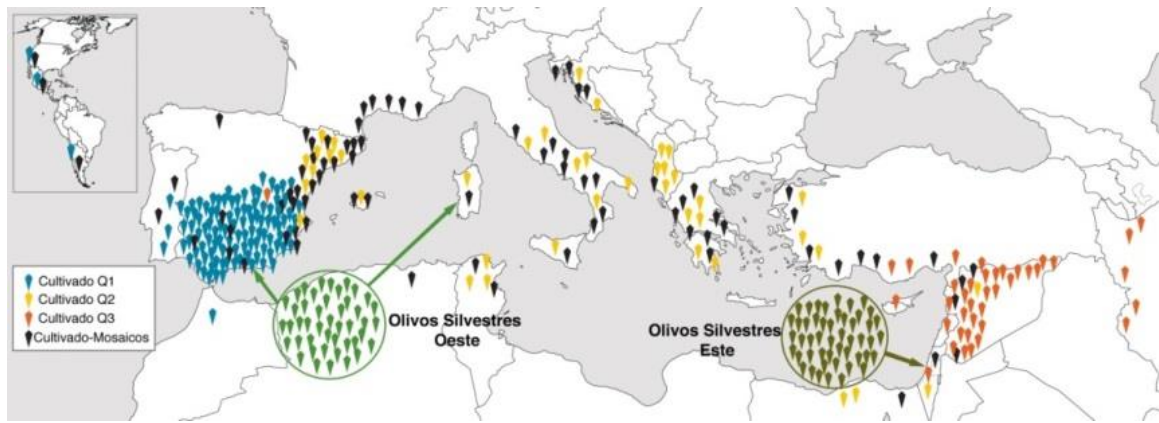


Figura 3. Expansión del olivo (*Olea europaea* ssp. *Europaea*) por la cuenca mediterránea. Los genotipos cultivados son del color correspondiente a su origen geográfico (Díez et al., 2015).

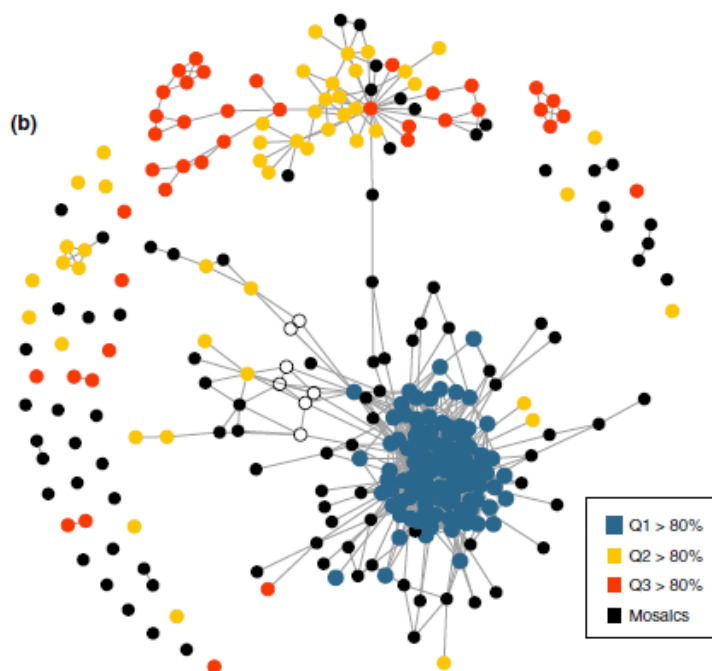


Figura 4. Red de las variedades de olivo anteriormente mencionadas, que muestra las conexiones entre familiares de primer grado (Díez et al., 2015).

En cuanto a la migración de las distintas variedades, es confusa, como demuestra que la mayor parte de los casi 1200 cultivares mediterráneos sean de ascendencia incierta (Bartolini et al., 2005). Por otra parte, en cada país la oleicultura tradicional tiene sus propias variedades y cultivares, y éstos son compartidos normalmente sólo en las zonas fronterizas (Rallo et al., 2005; Trujillo et al., 2014).

Existen varias cuestiones pendientes con respecto a cuántos eventos de domesticación se produjeron (uno o varios), la posible ubicación o ubicaciones de

dicha domesticación, las relaciones entre los cultivares, la relevancia de los cultivares en cuanto a la migración histórica, y el potencial flujo de genes entre las formas silvestres y domesticadas. Estas cuestiones han sido abordadas en diferentes estudios tanto arqueológicos como genéticos, pero, hasta la fecha los estudios genéticos han tenido limitaciones sustanciales, como, por ejemplo, centrarse en muestras de regiones locales, tales como España, Italia o Turquía (Baldoni et al., 2006; Belaj et al., 2010; Yoruk y Taskin, 2014).

Si bien estos estudios han sido útiles a escala local, no permiten extraer conclusiones históricas más amplias. No obstante, el estudio genético más completo sobre el olivo realizado hasta la fecha, ha demostrado que el 90% de las variedades de olivo de la Cuenca Mediterránea comparten el mismo clorotipo 'oriental-like'. Sobre la base de esta observación, los autores concluyen que, a pesar de los múltiples eventos de domesticación local, la frecuencia y el impacto de estos eventos locales fueron menores en comparación con el evento de domesticación original ocurrida en la Cuenca Mediterránea oriental (Besnard et al., 2013).

1.4.- Variabilidad genética del olivo

La variabilidad del olivo en España ha sido ampliamente descrita, basándose en caracteres morfológicos y moleculares (Barranco y Rallo, 2000; Gonzalo-Claros et al., 2000; Sanz-Cortéz et al., 2001; Belaj et al., 2004; Rallo et al., 2005; Díaz et al., 2006). Los marcadores moleculares como el ADN polimórfico amplificado aleatoriamente (RAPD) pone de manifiesto la amplia variabilidad genética de las especies de olivo a nivel regional (Sanz-Cortéz et al., 2001), nacional (Belaj et al., 2003), y referente a toda la Cuenca Mediterránea (Belaj et al., 2001). En algunos estudios, se analizaron cultivares de áreas pequeñas (provincias o regiones de España) mediante el uso de marcadores RAPD, y no se observó la agrupación aparente de acuerdo con el tamaño del fruto o de otro tipo de rasgo morfológico (Sanz-Cortéz et al., 2001).

La región de Extremadura es una importante productora de aceituna de mesa, principalmente de las 21 variedades autóctonas o locales de un total de 40 cultivares

distribuidos actualmente en las diferentes zonas agroecológicas. Aproximadamente el 80% de los cultivares de Extremadura corresponde a las variedades "Morisca", "Verdial de Badajoz", "Manzanilla Cacereña", "Manzanilla Carrasqueña", "Cornicabra", y "Pico Limón" (Delgado-Martínez, 2006). Estos cultivares han sido previamente identificados mediante el uso de rasgos morfológicos y marcadores RAPD (Díaz et al., 2006; Rallo et al., 2005; Belaj et al., 2004). En algunos estudios se ha detectado una alta diversidad genética entre las principales variedades de olivo cultivadas en la región de Extremadura (figura 5). (Delgado-Martínez et al., 2011).

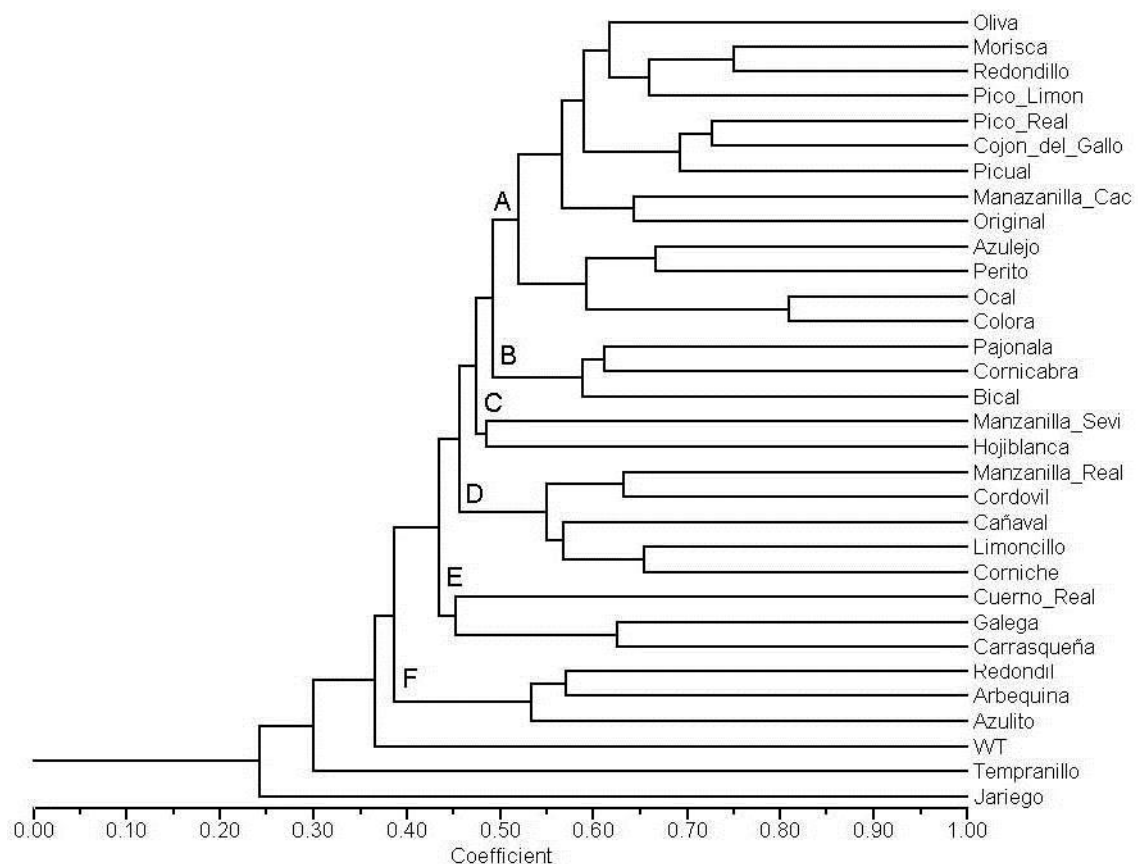


Figura 5. Relación filogenética de los cultivares extremeños establecida mediante marcadores RAPD. El dendrograma resultante indica diferencias claras entre todos los cultivares, con los coeficientes de similitud entre todos los posibles pares de genotipos que van desde 0,24 hasta 0,80. El análisis genético de los resultados mostró una distancia gradual entre los cultivares, lo que hace difícil identificar un grupo filogenético bien diferenciado (Delgado-Martínez et al., 2011).

1.5.- Características del olivo y la aceituna

El olivo pertenece a la familia de las Oleáceas, en la que se integran 29 géneros. Existen unas 35 especies del género *Olea*. Incluida en la especie *Olea europaea* L., se encuentran los olivos cultivados y silvestres, frecuentemente se le asocia la subespecie *sativa* a los olivos cultivados y la subespecie *sylvestris* a los olivos silvestres o acebuches (Barranco et al. 2008).

Es un árbol de tamaño mediano, de unos 4 a 8 metros de altura según la variedad, que puede permanecer vivo y productivo durante cientos de años. El hábitat natural del olivo se encuentra entre las latitudes 30º y 45º, tanto en el hemisferio norte como en el sur, es decir, en las regiones de clima mediterráneo, que se caracterizan por un verano seco y caluroso.

El fruto del olivo, la aceituna, es una drupa de tamaño variable que depende de la variedad, naturaleza de los suelos, climatología del año, condiciones del suelo, prácticas culturales, etc.

En la aceituna se pueden distinguir tres tejidos principales (figura 6):

EPICARPIO: es el tejido superficial que sirve de envoltura, representa entre el 2% y el 2,5% del peso del fruto, evoluciona en su color durante el proceso de maduración, desde un color verde pálido al negruzco, pasando por distintas coloraciones rojo-violáceas.

MESOCARPIO: es la pulpa o parte carnosa de la aceituna, representa entre el 70% y el 80% del peso del fruto y es de gran contenido en grasa.

ENDOCARPIO O HUESO: en cuyo interior se encuentra la semilla con el embrión, supone entre el 17% y el 23% del peso de la aceituna. Al conjunto de estos tres tejidos se le denomina pericarpio.

El agua representa un 50- 60% del peso de la pulpa, un 30% de la semilla, y un 9% del hueso. El aceite representa un 20-30% de la pulpa, un 27% de la semilla, y un 1% del hueso. Entre los azúcares destacan en importancia la glucosa, fructosa y sacarosa, y entre los polisacáridos la celulosa y hemicelulosa. En cuanto a las proteínas,

el aminoácido más importante que entra a formar parte de éstas es la arginina. Otros componentes mayoritarios de la pulpa son los compuestos fenólicos como la lignina, que se encuentran del 1 al 3% (Kiritsakis, 1992).

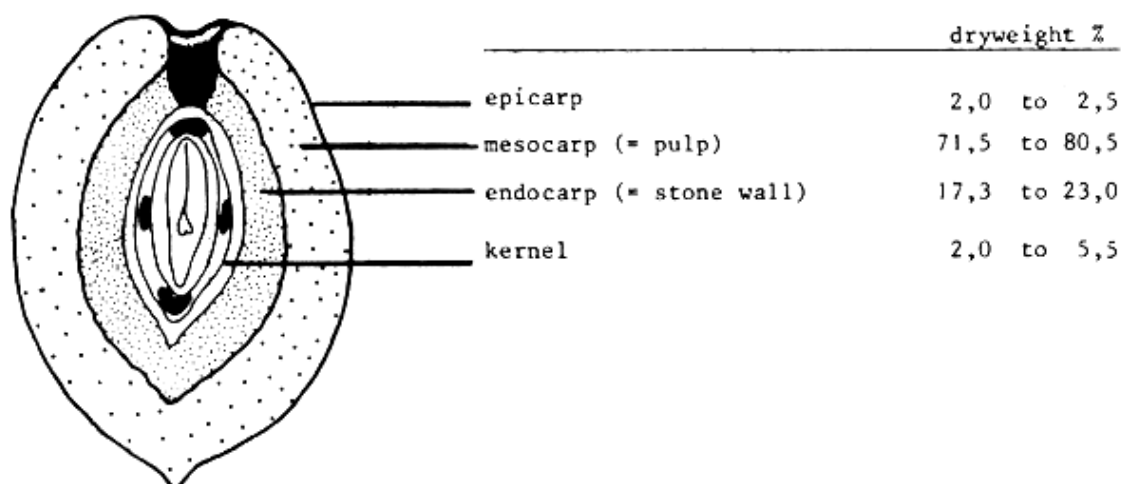


Figura 6. Composición del fruto de la aceituna. Sansouzy et al. (1985).

1.6.- Variedades de olivo

En España se cultivan 262 variedades de olivo, aunque sólo 24 alcanzan la categoría de variedad principal (Barranco et al., 2008). Cada una de ellas aporta unas características diferentes al aceite de oliva, tanto en la composición química como en la organoléptica. Atendiendo a su importancia y difusión se han clasificado en cuatro categorías: principales, secundarias, difundidas y locales. Variedades principales son aquellas que presentan una importante superficie cultivada o que son dominantes en al menos una comarca. Las variedades secundarias no llegan a dominar en ninguna comarca pero son base de plantaciones regulares. Las variedades difundidas y locales se encuentran como árboles aislados en varias o en una sola comarca respectivamente. Atendiendo a su aptitud pueden clasificarse en variedades de mesa y variedades para aceite. En la tabla 1 se encuentran las principales variedades, distribución y uso.

Extremadura presenta características bien diferenciadas del resto de España, en cuanto a variedades propias existentes implantadas en esta región y no frecuentes en

otros lugares. Además, las prácticas en el olivar y el manejo en las almazaras es el idóneo, obteniéndose aceites valorados por sus peculiaridades y buenas características organolépticas. Las principales variedades de aceitunas cultivadas en Extremadura son: Arbequina, Cornicabra, Manzanilla Cacereña, Manzanilla de Sevilla, Morisca, Picual y Verdial de Badajoz (VVAA, Catálogo Mundial de Variedades de Olivo, 2000), en este trabajo se usan las variedades Manzanilla de Sevilla y Morisca y se describen a continuación.

Tabla 1. Principales variedades españolas, su distribución geográfica y su uso. (A=aceite, M=mesa).

Cultivar	Uso	Area (x1.000 ha)	Difusión
'Picual'	A	860	Jaén, Córdoba, Granada
'Cornicabra'	A	269	Ciudad Real, Toledo
'Hojiblanca'	A-M	217	Córdoba, Málaga, Sevilla
'Lechín de Sevilla'	A	105	Sevilla, Cádiz
'Manzanilla de Sevilla'	M	85	Sevilla, Badajoz
'Morisca'	A	74	Badajoz
'Empeltre'	A	72	Zaragoza, Teruel, Baleares
'Arbequina'	A	71	Lérida, Tarragona
'Manzanilla Cacereña'	A-M	64	Cáceres, Salamanca
'Picudo'	A	45	Córdoba, Granada
'Farga'	A		Castellón, Tarragona
'Lechín de Granada'	A	36	Granada, Almería, Murcia
'Verdial de Huelva'	A	34	Huelva, Sevilla
'Gordal Sevillana'	M	30	Sevilla
'Verdial de Badajoz'	A	29	Badajoz, Cáceres
'Morrut'	A	28	Tarragona, Castellón
'Sevillanca'	A	25	Tarragona, Castellón
'Villalonga'	A	24	Valencia
'Castellana'	A	22	Guadalajara, Cuenca
'Verdial de Velez'	A	20	Málaga
'Alcoreña'	A-M	17	Málaga
'Blanqueta'	A	17	Alicante, Valencia
'Changlot Real'	A	5	Valencia
Alfarara	A	4	Valencia, Albacete
Otras	-	67	
Total España		2.280	

(Barranco et al.,2008)

1.6.1.- Manzanilla de Sevilla (figura 7)

También conocida como Carrasqueña, Manzanilla de Badajoz, Manzanilla, Manzanilla basta, Manzanilla blanca, Manzanilla común, Manzanillo, Romerillo y Varetuda. Es la variedad de mesa más difundida internacionalmente. En Extremadura se encuentra en las zonas de Tierra de Barros, Vegas del Guadiana y La Siberia. También se encuentra difundida en Portugal, Estados Unidos, Israel, Argentina y Australia.

El árbol es de vigor bajo-medio, porte abierto y densidad de copa media, siendo su inflorescencia de longitud corta, se adapta fácilmente al cultivo en plantaciones intensivas. El fruto es de peso elevado, de forma esférica y asimétrica. El ápice es redondeado con ausencia de pezón. La sección transversal máxima está centrada. Sus lenticelas son abundantes y pequeñas. La productividad es elevada y alternante. Su época de maduración es precoz y presenta elevada resistencia al desprendimiento. Es la variedad de mesa más apreciada internacionalmente por su productividad y calidad de fruto. También tiene un contenido aceptable en aceite cuando se destina a molino (Barranco, 2008)

Se considera susceptible a la asfixia radical, a la clorosis férrica, en suelos calizos, y al frío invernal. Se considera muy sensible a verticilosis y sensible a repilo, tuberculosis, lepra y mosca.



Figura 7. Variedad Manzanilla de Sevilla. <https://www.aceitesdeolivadeespana.com/la-importancia-de-las-variedades>.

1.6.2.- Morisca (figura 8)

También conocida como Basta, Cañaval Blanco, Cañaval Negro, Cordovil, Churro, de Pico, Gorda, Macho y Verdial. Esta variedad ocupa en España más de 75.000 ha, de las cuales 37.053 ha se encuentran en la provincia de Badajoz, ubicándose principalmente en las zonas oleícolas de Tierra de Barros y Jerez-Llerena. También se cultiva en el Alentejo, Portugal.

El árbol es de vigor medio, de porte erguido y densidad de copa espesa, siendo su inflorescencia de longitud media. El fruto es de peso muy elevado, de forma ovoidal y asimétrico. El ápice es redondeado presentando pezón. La sección trasversal máxima está centrada y su base truncada. Sus lenticelas son abundantes y pequeñas.

Se trata de una variedad rústica de gran adaptación a suelos pobres a la vez que sensible al frío invernal. Presenta escasa capacidad de enraizamiento y su época de maduración es tardía, con una resistencia al desprendimiento media. Tiene doble aptitud, es apreciada para aceite por su elevado rendimiento graso y para mesa por su tamaño y facilidad de aderezo (Barranco, 2008). Se considera susceptible a repilo, tuberculosis y mosca.



© Universidad de Córdoba

Figura 8. Variedad Morisca. <https://www.aceitesdeolivadeespana.com/la-importancia-de-las-variedades>.

1.7. El aceite de oliva

El cultivo del olivo identifica el clima mediterráneo (Angles, 1999), que de un modo u otro es un factor determinante en la vida de las personas en la misma cuenca mediterránea (Polunin y Huxley, 1987). En la cuenca mediterránea hay muchas variedades de olivos y esta región produce el 99% y consume el 87% de los aceites de oliva del mundo. Específicamente, los países mediterráneos de la Comunidad Europea, según el Consejo Oleícola Internacional (COI), producen y consumen el 70% de los aceites de oliva del mundo. Pese a que el aceite de oliva supone sólo un 4% de la producción mundial de aceite vegetal, gracias a su alto valor económico y nutricional, representa el 19% del valor del comercio mundial de aceites vegetales comestibles (Luchetti, 1993).

Recientemente, se estima que, entre 1986 y 1994, la superficie olivar cultivado de la UE creció en unas 100.000 ha, repartidas entre Grecia, España y Portugal, promovida por la política común de aceite de oliva de la UE (Droque, 2000). La mayoría de los nuevos olivares utilizan nuevos métodos de cultivo, habitualmente se expanden en regadíos (Guzman Alvarez, 1999), mientras que el sistema tradicional de cultivo se ha transformado progresivamente en sistemas semi-intensivos e intensivos (De Graaff y Eppink., 1999). Hoy en día, se pueden observar tres grupos principales de sistemas olivícolas. (Beaufoy, 1998; Guzman Alvarez, 1999): 1) Las cultivos intensivos, que se riegan con cosecha mecánica, 2) Cultivos semi-intensivos, donde se aplican criterios racionales de producción, y 3) Cultivos tradicionales, comúnmente en terrazas, y que se están quedando gradualmente circunscritos a tierras más o menos marginales.

Estos tres grupos presentan diferentes características económicas y ambientales. Los huertos de olivar irrigados tienen una producción que puede quintuplicar a la de los cultivos de secano (Romero, 1998). Por lo tanto, la olivicultura tradicional en tierras descuidadas o bastante accidentadas se ve amenazada por los nuevos olivares intensivos.

Durante los últimos años, algunos países donde existen regiones con clima de tipo mediterráneo, como Australia y Estados Unidos, han analizado la posibilidad de autoabastecerse del aceite de oliva (Droque, 2000).

Desde el punto de vista socioeconómico, en los países de la cuenca mediterránea, el olivo es uno de los cultivos más importantes, cuantitativa y cualitativamente, especialmente en España, Italia y Grecia. Su principal producto, el Aceite de Oliva Virgen, es muy valorado tanto por sus propiedades nutricionales como por sus características sensoriales, constituyendo uno de los pilares de la llamada dieta Mediterránea. Su composición en ácidos grasos monoinsaturados y sus antioxidantes naturales le otorgan numerosas propiedades beneficiosas para la salud (Tura et al., 2007; Ocakoglu et al., 2009).

En la cuenca mediterránea, la aceituna, junto con la vid constituye el equivalente socioeconómico de las industrias rurales del Norte. Esta equivalencia es importante, si bien no equiparable por el volumen de ingresos, al menos por el número de personas que se dedican, y han dedicado desde hace siglos, al cultivo de la aceituna. El aceite de oliva es uno de los bienes comerciales básicos de nuestra economía, y es parte primordial en los intercambios productivos entre el Norte y el Sur (Braudel, 1979). Al mismo tiempo, es destacable la posibilidad de explotación del suelo de los terrenos ocupados por olivares para la producción de diferentes productos agrícolas, principalmente cereales y leguminosas, así como para la alimentación de personas y ganado (Sereni, 1964). A lo largo de los siglos, los olivos han desempeñado un papel importante en el desarrollo rural, como una de las principales fuentes de ingresos y empleo en las zonas de lluvias relativamente escasas del Mediterráneo (De Graaff y Eppink, 1999).

El amplio uso de los productos derivados de la aceituna contribuye al aumento de las superficies cultivadas y, en el marco de una economía comercial, es normal que las zonas de cultivo del olivo estén en continua expansión (Sifnaiou, 1996). De hecho, el valor de las regiones oleícolas aumenta de forma continua, frente a la disminución de la importancia de los cultivos de cereales. Sin embargo, la mecanización de la agricultura, así como la introducción progresiva de sustitutos del aceite de oliva cada vez más baratos, provocó hace un par de décadas un declive en la importancia del cultivo del olivo, y causó un bache económico en las regiones que habían apoyado su desarrollo mediante el cultivo del olivo (Margaris, 1988). En la actualidad, según estimaciones de algunos autores, el aceite de oliva sólo tiene una cuota del 4% de la

producción mundial de aceite vegetal, que está dominada por la soja y el aceite de palma (Luchetti, 1993).

1.8.- Importancia ecológica del olivo

El cultivo del olivo ha dejado su huella en la fisonomía, en la economía y en la vida de todas las culturas de la cuenca mediterránea. Aunque constituya una forma de explotación del suelo por el hombre, es sin embargo un cultivo que marca distintivamente la vida y los ecosistemas de toda región donde se desarrolle. Los olivares constituyen una parte integral y significativa del medio ambiente y la cultura mediterránea, además, su importancia ecológica sólo ha sido recientemente reconocida.

Todas las referencias bibliográficas coinciden en que el ecosistema del olivo es notablemente estable, en comparación con otros ecosistemas agrícolas. Esto puede deberse a la estabilidad del hábitat, al relativamente pequeño número de plagas potencialmente perniciosas, a la tolerancia del olivo respecto a los daños causados por dichas plagas, y a la abundante fauna de artrópodos y su efecto positivo. La existencia de un número significativo de diversas plantas de la flora mediterránea en olivares cultivados asegura las condiciones para la creación de una gran variedad de hábitats para diferentes especies animales (Oikonomidou, 1969; Giourga et al., 1998).

El olivo tiene una abundante fauna de artrópodos, que comprende una centena de especies fitófagas además de otras descritas como útiles o indiferentes (Arambourg, 1986). De hecho, se han identificado 15 clases de insectos, que incluyen de 94 a 125 familias. El gran número de insectos y la rica flora aseguran el alimento para un número importante de aves. Concretamente, se han identificado 31 especies, tanto aves invernales (Suarez y Muñoz-Cobo, 1984) como anidadoras (Muñoz-Cobo, 1990). La existencia del olivo es, de hecho, clave para muchas especies durante el invierno (Niethammer, 1966), como el mirlo (*Turdus merula*) y el estornino (*Sturnus vulgaris*) (Debusshe e Isenmann, 1985; Jordano y Herrera, 1981), así como para las aves migratorias en ruta (Finlayson, 1981). Además, también se han localizado un gran

número de mamíferos, al ser los olivos árboles de hoja perenne, y al producir frutos con una alto poder energético, los cuales están disponibles durante el período de invierno.

En el caso de que los olivares se abandonen durante un largo período de tiempo, se convierten en prototipos de bosque mediterráneo, donde prevalecen las especies *Cistus creticus*, *Cistus salviaefolius*, *Erica verticillata*, *Anthyllis hermaniae*, *Genista acanthoclados*, *Plantago beilardi*, *Trifolium stellatum*, *Trifolium campestre*, *Asphodelus Microcarpus*, *Tuberaria guttata*, *Fillago gallica*, *Hypochoeris aetnensis*, *Tolpis virgata* e *Hymenocarpus circinatus*, dependiendo de las condiciones climáticas y territoriales de cada región (Vokou, 1988).

El suelo de olivares abandonados suele formar regiones preferenciales para el pastoreo. Por lo tanto, su explotación es intensa, teniendo como consecuencia la degradación de la productividad del suelo, debido a la intensidad de los fenómenos erosivos, mientras que al mismo tiempo se impide la regeneración natural de la vegetación (Chatteron y Chatteron, 1981). Como resultado de ello, hay una disminución significativa de la cobertura vegetal y un número limitado de especies de plantas leñosas en estos olivares abandonados. Las consecuencias no se refieren sólo a la biodiversidad y a la cobertura vegetal, sino también a la profundidad del suelo, que carece de la protección contra la erosión proporcionada por el rizoma de las plantas y la cobertura vegetal. La intensidad de los fenómenos erosivos en un olivar abandonado convertido en pastizal es evidente, ya que la profundidad del suelo de la arboleda se reduce de 30 cm a 10 cm y 6 cm después de veinte y treinta años de abandono, respectivamente (Margaris et al., 1988).

El mantenimiento del olivar tradicional es, por tanto, benigno para el medio ambiente, al presentar bajas tasas de erosión del suelo y una alta biodiversidad. Esto cobra aún más importancia si se tiene en cuenta que el olivar explota la productividad marginal de los suelos inclinados, que son precisamente los que corren el mayor peligro de deterioro. En estas zonas, las zonas cultivadas en terrazas muestran una baja erosión del suelo (De Graaff y Eppink, 1999). La conservación del olivar, en condiciones productivas, contribuye a la sostenibilidad de los recursos naturales

mediante el mantenimiento del suelo, la reducción de las pérdidas de lluvias y su explotación.

El olivo es una especie acumuladora, debido a su extenso sistema de enraizamiento, lo que lo convierte en uno de los pocos cultivos que pueden sobrevivir con sólo 200-300 mm de precipitación anual (Fresco, 1996). A lo largo de los siglos, el olivo es uno de los cultivos que jugó un papel clave en el mantenimiento de la productividad de los suelos estériles, secos y extremadamente erosionados del Mediterráneo. En estas zonas de terrazas, la erosión está disminuyendo con la protección del suelo mínimo y la reducción de la salida y las pérdidas de nutrientes, además de favorecer la percolación del agua hacia reservorios subterráneos (Warren, 1986).

1.9.- Importancia económica y ambiental del olivo

Hoy en día, el cultivo del olivo sigue siendo uno de los cultivos básicos en el Mediterráneo, dominando su paisaje rural. Su predominio en prácticamente todas las regiones con suelos inclinados, con productividad marginal, manteniendo una alta productividad en estas áreas. Además, el cultivo del olivo en sistemas semi-intensivos presenta bajos requerimientos en tratamientos químicos y maquinaria en comparación con otros cultivos agrícolas (Loumou, 1994).

La producción de aceite de oliva está concentrada mayoritariamente en los países mediterráneos, en los que se encuentra el 99% de la superficie del olivar y se genera el 98% de la producción mundial de aceite de oliva. La Unión Europea es el principal productor a nivel mundial en aceite de oliva con una producción superior al 80%, seguida por África (8,5%), Asia (5,5%) y América con un 2% de la producción mundial. Dentro de los países productores europeos, España destaca con un 28,3%. Su producción, por Comunidades Autónomas, puede verse en la Tabla 2.

España es el primer productor y exportador mundial de aceite de oliva, un producto que destaca además sobre los demás por su alta calidad y el elevado potencial tecnológico y de suministro.

En los últimos diez años, la producción española de aceite de oliva ha crecido fuertemente (por encima del millón de toneladas), superando con creces los cupos de producción asignados por la Unión Europea. Sin embargo, el consumo interior ha crecido mucho más lentamente, al tratarse de un sector maduro y muy influido por la evolución de los precios.

En su conjunto, el sector dirige sus exportaciones principalmente a Italia, Portugal, Estados Unidos, Reino Unido, Australia y Francia. Además, se está trabajando intensamente en la expansión de su consumo en otros mercados como Rusia, Países Escandinavos, Brasil, México y China, donde existen interesantes oportunidades de creciente incorporación de este producto. Los principales competidores del aceite de oliva español en los mercados mundiales son Italia, Grecia, Túnez, Turquía, Siria, Marruecos, Argelia y Portugal.

Tabla 2. Porcentaje de la producción total de aceite de oliva en España, por Comunidad Autónoma (Interprofesional, 2010).

Comunidad	% de la producción
Andalucía	80,67%
Castilla-La Mancha	7,08%
Extremadura	4,36%
Cataluña	3,59%
Com. Valenciana	2,13%
Aragón	0,77%
Resto CCAA	1,40%

Extremadura posee 253.200 hectáreas de olivar, siendo el cultivo que mayor superficie ocupa en la región. La producción total de los olivares españoles ronda las 5 millones de toneladas de aceitunas, que son empleadas principalmente en la producción de aceite y en aceituna de mesa (Llerena y Garrido, 2010).

Al ser cultivado en países de la cuenca mediterránea, el olivo está sujeto a severos factores climáticos como alta radiación solar, sequía, cambios drásticos de temperatura y salinidad elevada, lo que puede inducir situaciones de estrés y pérdidas

importantes en la productividad de los cultivos (Sofo et al., 2004a; 2004b). De entre los factores causantes del estrés, los más prevalentes son la salinidad, el déficit hídrico, la temperatura, la contaminación aérea, los metales pesados, los pesticidas y el pH del suelo, debido a que afectan casi todas las funciones de las plantas.

Tradicionalmente, la productividad del cultivo del olivo se ha visto alterada por el clima y la vecería, fenómeno que determina efectos cíclicos en el olivar, años de grandes cosechas seguidas de cosechas escasas. Sin embargo, el reciente uso de nuevos sistemas de cultivo y riego, la ampliación de las superficies productivas y la incorporación de nuevas y avanzadas tecnologías, han permitido obtener, incluso en condiciones climatológicas adversas, una producción media anual superior a 1.000.000 Tm. (Interprofesional, 2010), cifra que hace unos años hubiera sido considerada como "cosecha récord". El sector oleícola ha adquirido una marcada tendencia hacia la modernización tecnológica, principalmente con el objetivo de mejorar la calidad de los productos derivados del olivo, en busca de la excelencia, tanto en el nivel de calidad como en la certificación, buscando la diferenciación frente a otros importantes productores de la cuenca mediterránea (ICEX-Madrid, 2004).

El consumo del aceite de oliva a nivel mundial es, comparado con el de otras grasas destinadas a fines alimentarios, bastante bajo. Esto se debe a que, normalmente, en cada región geográfica se suele dar preferencia al tipo de aceite que se produce, en base a los cultivos locales. Pese a ello, el consumo del aceite de oliva ha aumentado considerablemente, tanto en los países no productores como en los que lo producen en menor medida, pudiendo ser su capacidad de penetración en el mercado muy elevada. La principal razón de este aumento en el consumo del aceite de oliva es las numerosas propiedades beneficiosas para la salud que posee, y que son ampliamente reconocidas.

El sistema de producción del aceite de oliva conduce a precios más elevados que el de otros aceites sustitutivos, pero el aumento del poder adquisitivo de ciertas regiones, unido al valor que se le da como producto saludable y de interés gastronómico, hace que haya un incremento de su consumo fuera de las zonas geográficas de producción. Una labor constante de información, basada en

fundamentos científicos de sus propiedades nutricionales y saludables, no pude faltar para que la expansión del consumo continúe y se adapte a los aumentos de la producción (Barranco et al. 2008).

Además de su relevancia a nivel económico para estas zonas, los productos derivados del olivo son clave en los hábitos alimenticios de los países del sur de Europa. La evidencia a nivel epidemiológico sugiere que un alto consumo de aceite de oliva, uno de los principales componentes de la dieta mediterránea, está asociado con una reducción del riesgo de desarrollo de enfermedades como síndrome metabólico, diabetes tipo 2, cáncer, enfermedad cardiovascular, obesidad y desordenes cognitivos (Martínez-González et al., 2014).

El aceite de oliva virgen extra es un producto clave de la dieta mediterránea, un alimento de máxima calidad cuyos beneficios y valores están asociados a la salud y avalados, entre otros, por estudios del Instituto Europeo de la Alimentación Mediterránea, que subrayan sus propiedades anticancerígenas y antienvjecimiento, y su contribución a la prevención y reducción de las enfermedades cardiovasculares.

Una característica notable de la dieta mediterránea es, a través del consumo de aceite de oliva, la abundante ingesta de ácido oleico. El aceite de oliva puede representar casi el 20% de la ingesta total de energía en los países donde su consumo está extendido. Los primeros estudios han mostrado asociaciones inversas entre el consumo medio de aceite de oliva en el país y el riesgo de enfermedad cardiovascular o de mortalidad total. Además, también hay pruebas de que la ingesta de aceite de oliva puede tener una influencia beneficiosa sobre los factores de riesgo cardiovascular. De importancia potencial, se ha sugerido que algunos componentes secundarios de aceite de oliva distintos del ácido oleico contribuyen a propiedades antiinflamatorias, antioxidantes y otras propiedades bioactivas que pueden beneficiar al endotelio, modular favorablemente los factores hemostáticos y mejorar la estabilidad de la placa arterosclerótica (Martínez-González, et al., 2014).

El cultivo del olivar vive una época incierta, aunque no exenta de esperanzas y buenas expectativas. La rusticidad y longevidad de la especie hace que se encuentren con facilidad árboles milenarios y plantaciones centenarias, por tanto dicho cultivo

presenta una superficie creciente debido a que el olivo se asienta en todo tipo de terrenos, a veces poco fértiles, otras en pendientes sometidas al efecto de la erosión, dónde otros cultivos son incapaces de producir, e incluso en zonas secas y áridas, con precipitaciones escasas y prolongados periodos con déficit hídrico. Como hemos mencionado anteriormente, España e Italia son los principales productores a nivel mundial, seguidos de Grecia, Turquía y Túnez. En España la región olivarera por excelencia es Andalucía, seguida en importancia por Castilla La Mancha, Extremadura y Cataluña.

2. Mecanismo de defensa en plantas. Producción de Especies Reactivas del Oxígeno (ROS).

2.1.- Especies Reactivas del Oxígeno (ROS)

Las especies reactivas del oxígeno (ROS) se producen como una respuesta normal del metabolismo aeróbico celular de las plantas. Aproximadamente el 1 % del O_2 consumido por las plantas está directamente implicado en la formación de ROS en los diferentes compartimentos celulares (Sharma et al., 2012). Sin embargo, diferentes estreses tanto abióticos (sequía, salinidad, frío, toxicidad por metales pesados, radiación UV-B) como bióticos, conducen a una mayor generación de ROS en las plantas, rompiendo la homeostasis celular (Shah et al., 2001; Mittler, 2002; Sharma y Dubey, 2005; 2007; Hu et al., 2008; Han et al., 2009; Maheshwari y Dubey, 2009; Tanou et al., 2009; Mishra et al., 2011; Srivastava y Dubey, 2011). Además de las ROS formadas en cloroplastos, mitocondrias y peroxisomas, también se sintetizan ROS por la NADPH oxidasa (NOX), análogo de la respiratory burst oxidase homolog (Rboh), (Sagi y Fluhr, 2006) y las peroxidasas (Demidchik, 2015)

Los ROS más comunes incluyen radicales libres tales como el anión superóxido (O_2^-), radicales hidroxilo ($\bullet OH$), así como no radicales como peróxido de hidrógeno (H_2O_2), singlete oxígeno (1O_2), y otros (figura 9). La reducción por pasos de oxígeno molecular (O_2) conduce a la producción de ROS altamente reactivas (Foyer y Harbinson, 1994; Foyer, 1997; Del Río et al., 2006; Blokhina y Fagerstedt, 2010; Heyno et al., 2011).

El O_2 en su estado fundamental es una molécula totalmente inofensiva. Tiene dos electrones desapareados con spins paralelos, lo cual lo hace paramagnético y, por tanto, con pocas probabilidades de participar en reacciones con moléculas orgánicas, a menos que se active (Apel y Hirt, 2004). La activación del O_2 puede producirse mediante dos mecanismos: la absorción de suficiente energía como para invertir el spin en uno de los electrones no apareados, o bien mediante una reducción gradual monovalente (figura 10). Los electrones de la forma birradical del oxígeno tienen

electrones que giran en paralelo, pero, como hemos mencionado anteriormente, la absorción de suficiente energía puede invertir el giro de uno de esos electrones desapareados, conduciendo a la formación del estado singlete, donde los dos electrones tienen spins opuestos.

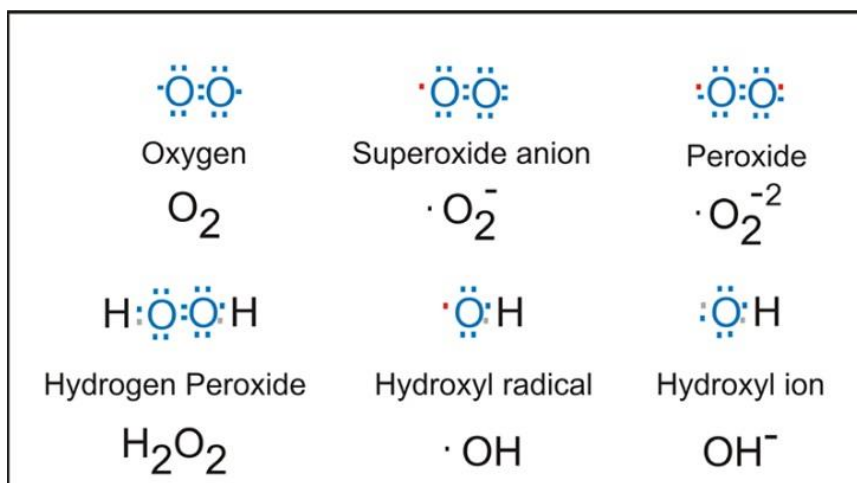


Figura 9. Especies Reactivas del Oxígeno (ROS).
https://www.biotech.com/assets/tech_resources/10592a/figure1.jpg.

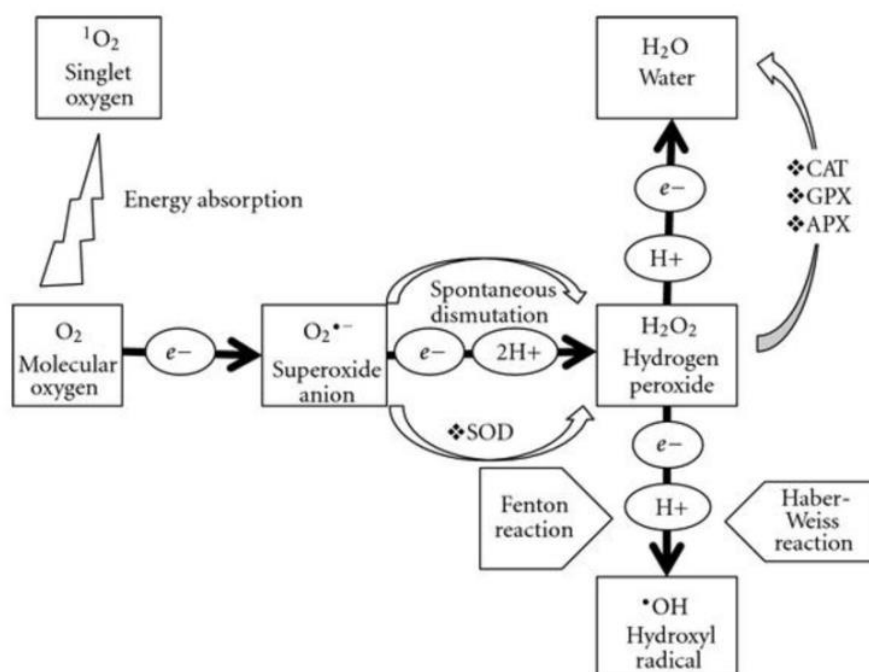


Figura 10. Representación esquemática de la generación de ROS en plantas (Sharma et al., 2012).

El tiempo de vida de $^1\text{O}_2$ dentro de la célula es probablemente 3 μs o menos (Hatz et al., 2007; Hackbarth et al., 2010). Se ha demostrado que una molécula de O_2 es capaz de difundir a través de considerables distancias (varios cientos de nanómetros), pudiendo durar 4 μs en agua y hasta 100 μs en un entorno no polar. El $^1\text{O}_2$ reacciona con la mayoría de las moléculas biológicas que se encuentren cerca, por ejemplo, oxida directamente proteínas, ácidos grasos insaturados, o ADN (Wagner et al., 2004), causando modificaciones en ácidos nucleicos mediante la reacción selectiva con la desoxiguanosina (Kasai, 1997). Se cree, también, que es responsable de la pérdida inducida por la luz del fotosistema II (PSII), actividad que puede desencadenar la muerte celular (Krieger-Liszkay et al., 2008).

El O_2^- es la ROS primaria que se forma en la célula, y es el precursor de una cascada de reacciones que generan ROS "secundarias", ya sea directamente, o a través de reacciones catalizadas por enzimas o metales (Valko et al., 2005), en función del tipo de célula o compartimento celular. El O_2^- es moderadamente reactivo, con una vida media corta (aproximadamente 1 μs). El O_2^- puede aceptar un electrón y dos protones para formar H_2O_2 , bien de forma no enzimática, o en una reacción catalizada por la SOD. El H_2O_2 se genera en las células de forma natural, o bien como consecuencia de una gran variedad de condiciones estresantes como pueden ser la sequía, el frío, la radiación UV, la exposición a luz intensa, heridas o infección producidas por patógenos. Las principales fuentes de generación de H_2O_2 en las células vegetales son las cadenas de transporte de electrones (CTE) de cloroplastos, mitocondrias, retículo endoplásmico y plasmalema. También contribuyen a la producción de H_2O_2 la β -oxidación de los ácidos grasos y la fotorrespiración. El H_2O_2 es moderadamente reactivo y tiene una vida media relativamente larga (1 ms) (Mittler y Zilinkas, 1991). El H_2O_2 no tiene electrones desapareados, lo que le permite atravesar sin dificultad membranas biológicas y, en consecuencia, pueden causar daños en tejidos alejados de su origen. Dado que el H_2O_2 es la única ROS que puede difundirse a través de las hidroporinas de las membranas, y recorrer distancias más grandes dentro de la célula (Bienert et al., 2007), y debido a que es relativamente estable en comparación con otras ROS, se le considera muy importante como molécula de señalización en la regulación de procesos biológicos específicos que se desencadenan

como respuesta a diversos estreses medioambientales (Neill et al., 2002; Yan et al., 2007; Torres et al., 2002). A altas concentraciones, el H_2O_2 puede oxidar la cisteína (-SH) o residuos de metionina (-SCH₃), o inactivar enzimas a través de la oxidación de los grupos tiol, como las enzimas del ciclo de Calvin, Cu / Zn-SOD, y Fe-SOD (Halliwell y Gutteridge, 1999). Cuando las concentraciones de peróxido de hidrógeno alcanzan niveles de 10 μM , las enzimas del ciclo de Calvin fructosa-1,6-bisfosfatasa, sedoheptulosa-1,7-bisfosfatasa, y fosforibulocinasa, pierden hasta el 50% de su actividad (Kaiser, 1979; Leegood y Walker, 1982). También oxida proteínas quinasas, fosfatasas y factores de transcripción que contienen residuos tiolato. En altas concentraciones, orquesta programas de muerte celular (Dat et al., 2000).

Tanto el O_2^- como el H_2O_2 son moderadamente reactivos, lo que ha llevado a asumir que el daño celular por ROS parece ser debido a su conversión en especies más reactivas. La formación de $\bullet\text{OH}$ depende tanto de H_2O_2 como de O_2^- , y, por tanto, está sujeta a la inhibición por SOD y CAT. La reacción de Haber-Weiss genera $\bullet\text{OH}$ a partir de H_2O_2 y O_2^- . Es una reacción catalizada por Fe, y parece claro esta catálisis metálica es necesaria, ya que la velocidad de la reacción no catalizada es insignificante (Rigo et al., 1977).

El radical hidroxilo ($\bullet\text{OH}$), es la ROS más reactiva. Tiene un solo electrón desapareado, tiene capacidad de interactuar con todas las moléculas biológicas y provoca daños celulares como peroxidación de lípidos, daños en proteínas, y destrucción de la membrana (Foyer et al., 1997). Debido a que las células no disponen de ningún mecanismo para eliminar el $\bullet\text{OH}$, su producción no controlada puede conducir a la muerte celular (Pinto et al., 2003). La oxidación de sustratos orgánicos mediante $\bullet\text{OH}$ puede proceder por dos posibles reacciones, la adición de $\bullet\text{OH}$ a moléculas orgánicas, o la sustracción de un átomo de hidrógeno. Debido a la corta duración del estado “libre” (por su alta reactividad), los sitios de reacción del $\bullet\text{OH}$ suelen estar cerca de sus lugares de formación (Elstner, 1982). En este contexto, los radicales orgánicos de oxígeno tales como alcoxi-, peróxi- y semiquinonas, peróxido de hidrógeno reducido y complejos donadores de electrones-peróxido de hidrógeno (cripto - OH), así como complejos de metal-oxígeno, se han propuesto como las

especies más destructivas en última instancia, además de los ya mencionados $\bullet\text{OH}$ activos libres (Elstner, 1987).

Todas las ROS son extremadamente perjudiciales para los organismos cuando se encuentran en concentraciones anormalmente altas, aunque no sólo son productos tóxicos derivados del metabolismo aeróbico sino que también son moléculas señales involucradas en varios procesos de desarrollo en todos los organismos. Cuando el nivel de ROS excede el considerado normal, se dice que la planta está en un estado de "estrés oxidativo", esta situación puede ser una amenaza para las células, al causar reacciones potencialmente perjudiciales como peroxidación de lípidos, oxidación de proteínas, daño a los ácidos nucleicos, inhibición enzimática, y, en última instancia, activación de la muerte celular programada (Shah et al., 2001; Mittler, 2002; Verma y Dubey, 2003; Meriga et al., 2004; Sharma y Dubey, 2005; Maheshwari y Dubey, 2009; Mishra et al., 2011; Srivastava y Dubey, 2011).

Tabla 3. Características generales de las ROS (Das y Roychoudhury, 2014).

ROS	$t_{1/2}$	Migration distance	Sources	Mode of action	Reaction with DNA	Reaction with protein	Reaction with DNA	Scavenging systems
Superoxide ($\text{O}_2^{\bullet-}$)	1–4 μs	30 nm	Membranes, Chloroplasts, Mitochondria	Reacts with double bond containing compounds such as (Fe-S) proteins	No	Via the Fe-center	Extremely low	SOD
Hydroxyl radical (OH^\bullet)	1 μs	1 nm	Membranes, Chloroplasts, Mitochondria	Extremely reactive with all biomolecules	Rapidly reacting	Rapidly reacting	Rapidly reacting	Flavonoids and Proline
Hydrogen Peroxide (H_2O_2)	1 ms	1 μm	Membranes, Chloroplasts, Mitochondria, Peroxisomes	Oxidizes proteins and forms OH^\bullet via $\text{O}_2^{\bullet-}$	No	Attacks the Cys residue	Extremely low	CAT, POXs and Flavonoids
Singlet Oxygen ($^1\text{O}_2$)	1–4 μs	30 nm	Membranes, Chloroplasts, Mitochondria	Oxidizes proteins, PUFA and DNA	Reacts with G residue	Attacks Trp, His, Tyr, Met and Cys residues	PUFA	Carotenoids and α -Tocopherol

La producción de ROS es también necesaria para la defensa de las plantas, tienen una importante función biológica en la respuesta de aclimatación de plantas a estreses abióticos; son moléculas señales durante el crecimiento celular, el control de apertura y cierre de estomas, las interacciones planta-patógeno, la muerte celular programada y la respuesta a estreses. Los niveles de ROS deben estar controlados, por una parte existen unos sistemas productores y otros sistemas antioxidantes que los eliminan.

Este equilibrio puede ser perturbado por diferentes estreses bióticos y abióticos (figura 11).

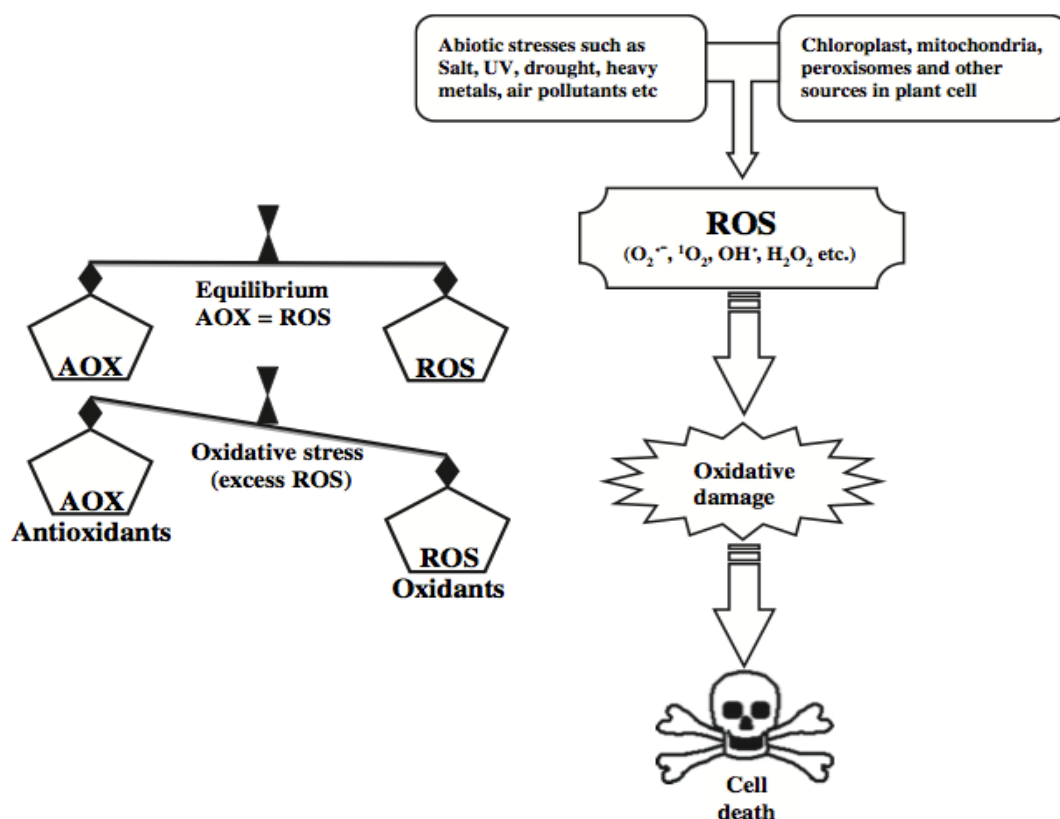


Figura 11. Equilibrio entre la producción de ROS y los sistemas antioxidantes. EL estrés abiótico induce la producción de ROS y la muerte celular (Gill y Tuteja, 2010).

2.2. Principales fuentes de ROS relacionadas con las reacciones de defensa

Choudhury et al. (2017) indican que las dos principales causas de aumento de ROS durante el estrés abiótico son: 1) La alteración de la actividad metabólica (ROS metabólicas) y 2) La generación de ROS con el propósito de señalización como parte de la señal y respuesta al estrés (ROS de señalización) (figura 12). Las ROS metabólicas y de señalización podrían producirse en diferentes compartimentos subcelulares (por ejemplo, ROS metabólicas en el cloroplasto y ROS de señalización en el apoplasto). Sin embargo, ambas formas pueden interactuar entre ellas e intervenir en la aclimatación de la planta al estrés.

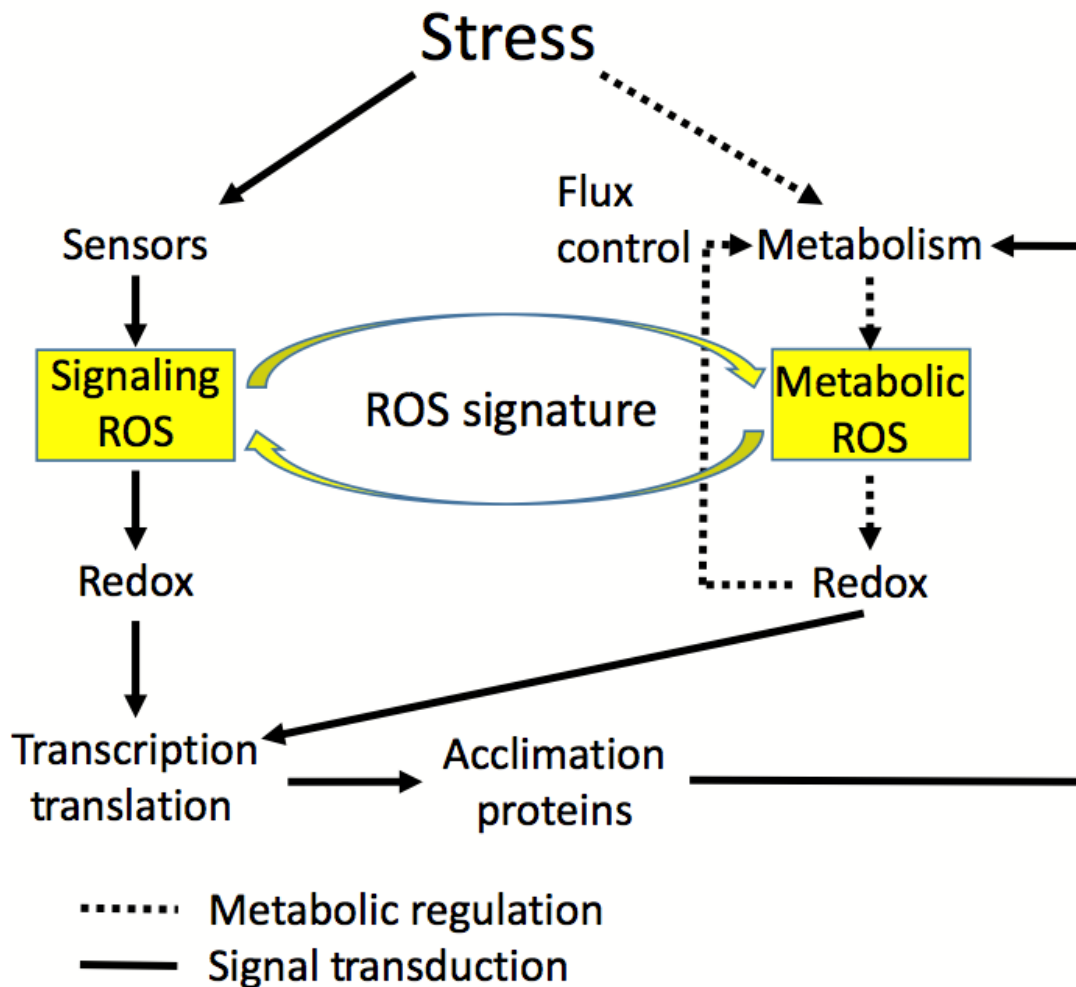


Figura 12. Producción de ROS en respuesta al estrés abiótico: ROS metabólicas y ROS de señalización, la interacción entre ambas conducen a la adaptación de la planta. (Choudhury et al., 2017).

Las ROS se producen en cloroplastos, mitocondrias, peroxisomas, retículo endoplásmico, núcleo y apoplasto (figura 13). Los cloroplastos y peroxisomas son los orgánulos principales en la producción de ROS en partes verdes; en las partes no verdes o en la oscuridad el orgánulo principal es la mitocondria.

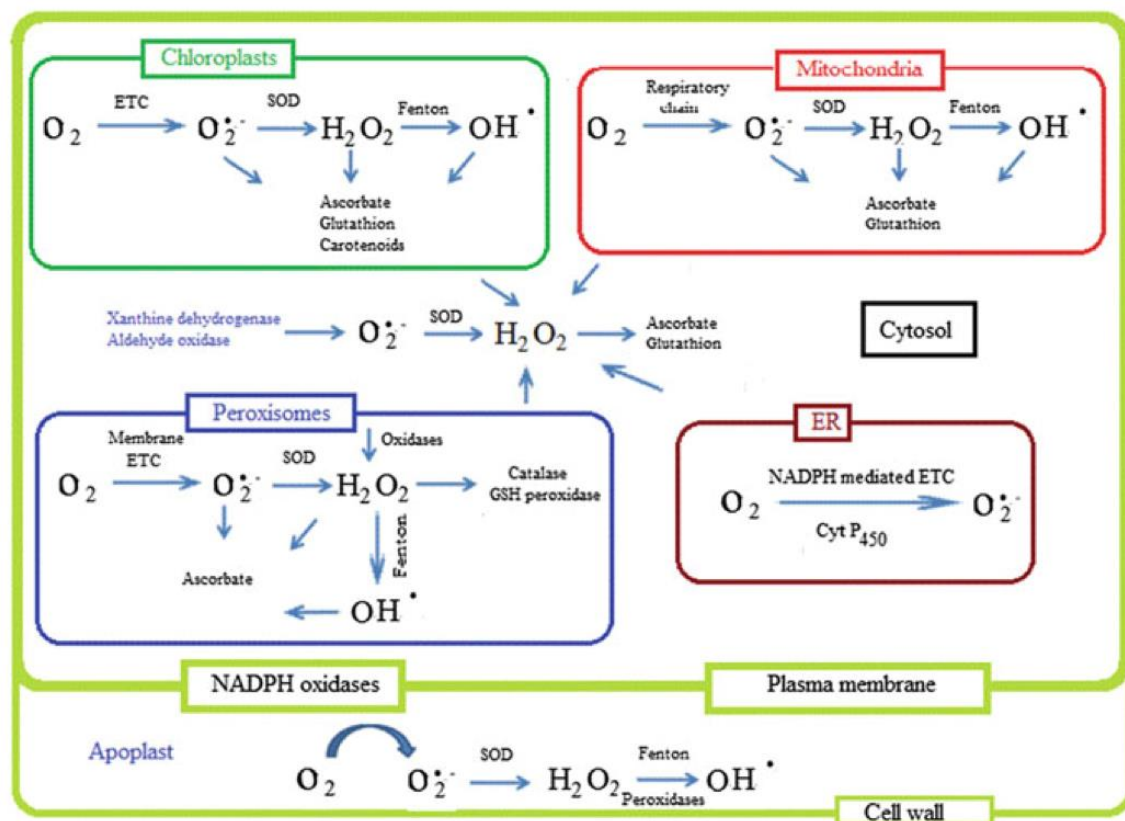


Figura 13. Localización subcelular de la producción de ROS (Trchounian et al., 2016).

En la cadena de transporte electrónico mitocondrial se encuentran electrones con suficiente energía libre para reducir directamente al O_2 , esta se considera la principal fuente inevitable de ROS en la mitocondria ligada a la respiración aeróbica en condiciones normales (Rhoads et al., 2006). Sin embargo, esta producción de ROS puede mejorar en respuesta a distintos estreses. Las mitocondrias de las plantas pueden controlar la generación de ROS mediante sistemas de disipación de energía, pudiendo desempeñar un papel central en la adaptación de las células al estrés abiótico.

En los cloroplastos, el oxígeno generado por las reacciones fotosintéticas, puede aceptar electrones de los fotosistemas y producir ión superóxido. En condiciones de estrés abiótico aumenta la producción de ROS (singlete de oxígeno, ión superóxido, peróxido de hidrógeno y radical hidroxilo, figura 14) en los cloroplastos, cuando la cadena electrónica se sobrecarga, una parte del flujo de electrones se desvía de la ferredoxina al oxígeno (en lugar de al $NADP^+$) mediante la reacción de Mehler.

Chloroplast

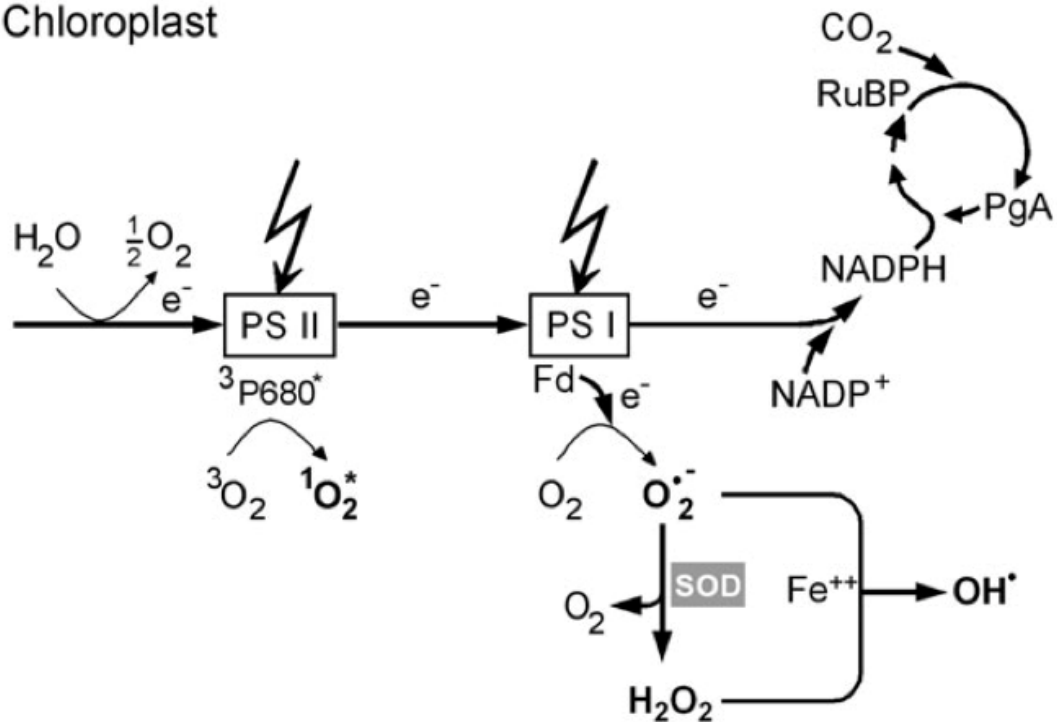


Figura 14. Producción de ROS en cloroplastos (Apel y Hirt, 2004).

Los peroxisomas producen ión superóxido como consecuencia de su metabolismo normal. Corpas et al. (2008) sugieren considerar a los peroxisomas como unos orgánulos celulares con la capacidad de generar y liberar al citosol moléculas señal como H_2O_2 , $O_2^{\bullet-}$ y NO^{\bullet} Implicadas en procesos de defensa. El aumento de ROS en peroxisomas, durante el estrés abiótico es debido principalmente al aumento de la fotorrespiración (Gill y Tuteja, 2010).

En el citosol se han caracterizado varias fuentes de ROS y durante diferentes estreses ocurren cambios en el estado redox del citosol esto juega un importante papel en la señalización oxidativa (Noctor y Foyer, 2016).

Noctor y Foyer (2016) indican que bajo condiciones de estrés los cloroplastos, peroxisomas y mitocondrias podrían extender sus estructuras membranosas que se pondrían en contacto con la envoltura nuclear, alterando el estado ROS del núcleo.

Otra fuente de ROS es el retículo endoplasmático, como ponen de manifiesto Ozgur et al. (2014), en *Arabidopsis thaliana* donde se producen ROS en el retículo endoplasmático como respuesta a la salinidad.

En el apoplasto, participando proteínas del plasmalema y de la pared celular, ocurre el llamado “burst” o choque oxidativo (aumento rápido de ROS) en respuesta al ataque de patógenos. Una de las principales fuentes de ROS en el apoplasto es la NADPH oxidasa del plasmalema que mediante la oxidación del NADPH citoplasmático reduce al oxígeno formando $O_2^{\cdot-}$ que dismuta rápidamente a H_2O_2 .

Otra fuente de ROS en el apoplasto, son las peroxidasas apoplásticas unidas iónica o covalentemente a la pared celular, estas peroxidasas tienen dos ciclos catalíticos, bien consumen H_2O_2 , en presencia de sustratos fenólicos sintetizando lignina u otros compuestos fenólicos o bien los sustratos fenólicos son sustituidos por compuestos reducidos (como NADPH) y producen H_2O_2 (Apel y Hirt, 2004).

Las poli(di)amino oxidasas son unas enzimas localizadas en la pared celular que mediante la oxidación de poli(di)aminas producen H_2O_2 , estas enzimas parecen estar implicadas en el catabolismo teminal causando la muerte celular programada (Kuehn y Phillips, 2005).

Otra enzima que produce ROS en el apoplasto, en condiciones de estrés, es la oxalato oxidasa, que a partir del ácido oxálico genera CO_2 y H_2O_2 , parece estar implicada en la aclimatación a la sequía (Voothuluru y Sharp, 2013).

2.3. Sistemas antioxidantes en plantas

Para protegerse de los efectos tóxicos de las ROS las células de las plantas poseen sistemas antioxidante de defensa, enzimáticos y no enzimáticos.

2.3.1. Sistemas enzimáticos

Los principales sistemas enzimáticos antioxidantes son: superóxido dismutasa (SOD), catalasa (CAT), peroxidasas (POX), enzimas del ciclo glutatión-ascorbato (GSH/AsA), como son ascorbato peroxidasa (APX), monodeshidroascorbato reductasa (MDHAR), dehidroascorbato-reductasa (DHAR) y glutatión reductasa (GR) (Noctor y Foyer, 1998).

a) Superóxido dismutasa

La superóxido dismutasa (SOD) juega un papel clave en la primera línea de defensa contra el estrés oxidativo en todos los organismos aeróbicos (Scandalios, 1993) y es uno de los principales sistemas enzimáticos antioxidantes de las plantas. La enzima SOD pertenece al grupo de metaloenzimas y cataliza la dismutación de O_2^- a O_2 y H_2O_2 . Está presente en la mayoría de los compartimentos subcelulares donde se generan ROS, cloroplasto, mitocondria, citosol, peroxisoma y apoplasto (Mittler, 2002). En plantas, se conocen tres isoenzimas de SOD, Cu/Zn SOD, Mn-SOD y Fe-SOD (Fridovich, 1989; Racchi et al., 2001). Todas las formas de SOD son codificadas en el núcleo y dirigidas a los diferentes compartimentos subcelulares (Bowler et al., 1992). La actividad de la SOD se encuentra aumentada en las plantas expuestas a estrés ambiental, como sequía y toxicidad por metales (Sharma y Dubey, 2005; Mishra et al., 2011). El aumento de la actividad de la SOD a menudo se correlaciona con el aumento de la tolerancia de la planta frente al estrés ambiental (Gupta et al., 1993).

b) Catalasa

Entre las enzimas antioxidantes, la catalasa (CAT) fue la primera en ser descubierta y caracterizada. Son porfirinas de Fe tetraméricas. Es una enzima que cataliza la dismutación de dos moléculas de H_2O_2 en agua y oxígeno. La afinidad por el H_2O_2 , está en el rango de mM (menor afinidad que la APX). El H_2O_2 generado en los peroxisomas (principal orgánulo de producción de H_2O_2) durante la oxidación fotorespiratoria, la β -oxidación de ácidos grasos, y otros sistemas enzimáticos, son eliminados por la CAT (Scandalios et al., 1997; Corpas et al., 2008). Su presencia en citosol, cloroplastos, y mitocondrias es significativamente menor (Mhamdi et al., 2010). Se han descrito tres clases genéticas de CAT (Willekens et al., 1995), las CAT clase I que se expresan en tejidos fotosintéticos, las CAT clase II que se expresan en los tejidos vasculares, y las CAT clase III que son muy abundantes en semillas y plantas jóvenes. Cuando se produce un exceso de H_2O_2 a través de procesos catabólicos, éste es degradado por la CAT, de una forma energéticamente eficiente (Mallick y Mohn, 2000). El estrés ambiental hacen que la actividad de la CAT aumente o disminuya,

dependiendo de la intensidad, la duración y tipo de estrés (Moussa y Abdel-Aziz, 2008).

c) Peroxidasas

Las peroxidasas, sobre todo las que se encuentran en el apoplasto, como se ha indicado anteriormente, pueden producir o eliminar ROS. El estrés modula la actividad de las peroxidasas y también estimula su liberación al apoplasto, la pared celular tiene una gran capacidad de retener distintas isoformas de peroxidasas.

d) Las enzimas del ciclo ascorbato-glutatión

El descubrimiento del ciclo del ascorbato-glutatión (ASA-GSH) (figura 15), también conocido como vía de Halliwell-Asada, en todos los compartimentos celulares, así como la alta afinidad de la APX (rango de μM) por el H_2O_2 , sugieren que este ciclo juega un papel crucial en el control de los niveles de ROS en estos compartimentos. (Mittler, 2002).

El ácido ascórbico y el glutatión, que se encuentran en altas concentraciones en cloroplastos y otros orgánulos, son cruciales para la defensa de las plantas en contra del estrés oxidativo, en general es necesario mantener alta la relación reducido/oxidado para ambos compuestos, así la GR y la MDAR y DHAR (enzimas del ciclo) la mantienen.

Cada enzima de este ciclo tiene diferentes isoformas subcelulares que son diferencialmente reguladas por diferentes tipos de estreses (Pandey et al., 2015).

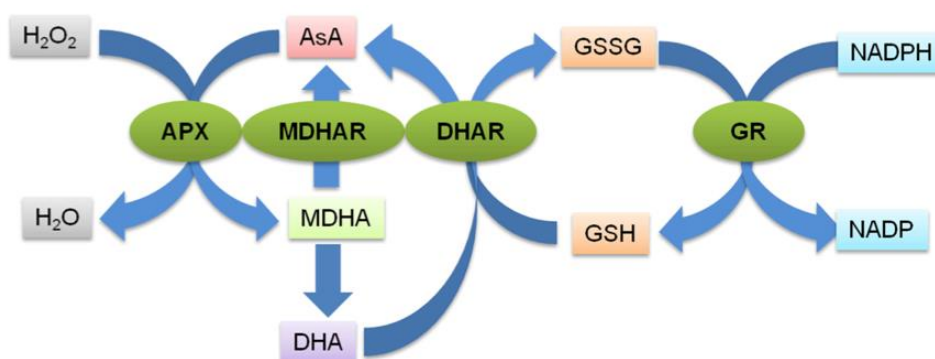


Figura 15. Ciclo Ascorbato/Glutatión en plantas (Pandey et al., 2015).

-Ascorbato peroxidasa

La ascorbato peroxidasa (APX), es la primera enzima del ciclo ASA-GSH, utiliza dos moléculas de AsA para reducir el H_2O_2 a agua generando dos moléculas de MDHA. La APX es un miembro de la clase I de la superfamilia de las hemoperoxidasas (Welinder, 1992) y está regulada por señales redox y por las concentraciones de H_2O_2 (Patterson y Poulos, 1995). Se han descrito diferentes isoenzimas en diferentes compartimentos (citósol, peroxisomas y cloroplastos, Pandey et al, 2015).

La APX es considerada como una de las enzimas antioxidantes más ampliamente distribuidas en las células vegetales, y sus isoformas tienen una afinidad para el H_2O_2 mucho mayor que la CAT, haciendo que la APX sea uno de los eliminadores de H_2O_2 más eficientes de bajo condiciones de estrés (Wang et al., 1999). Se ha demostrado el aumento de expresión de APX en plantas durante diferentes condiciones de estrés tanto biótico como abiótico (Gill y Tuteja, 2010).

-Monodehidroascorbato reductasa (MDHAR).

La monodeshidroascorbato reductasa (MDHAR) es una enzima flavinadenin dinucleótido que cataliza la regeneración de ASA a partir del radical MDHA, utilizando para ello NAD(P)H como donador de electrones (Hossain y Asada, 1985). Dos moléculas de MDHA pueden reaccionar no enzimáticamente y generar AsA y DHA, aunque la mayor parte de la reducción del MDHA es mediante la actividad de la MDHAR.

En plantas superiores forman una múltiple familia con distintas isoformas en diferentes compartimentos celulares (peroxisomas, cloroplastos, mitocondrias y citósol). Para evitar los efectos deletéreos de las ROS debe haber un pool suficiente de AsA en estado reducido, por ello, la MDHAR tiene un papel considerable en la tolerancia a múltiples estreses (Pandey et al, 2015).

-Dehidroascorbato reductasa (DHAR).

La dehidroascorbato reductasa (DHAR) cataliza la reducción de DHA a AsA usando GSH como donador de electrones (Ushimaru et al., 1997) y, por tanto, desempeña un papel importante en el mantenimiento de los niveles de AsA en su

forma reducida. Pese a la posibilidad de regeneración de AsA directamente desde MDHA, ya sea de forma enzimática o no enzimática, se puede producir DHA cuando el AsA se oxida en hojas y otros tejidos. El DHA, un producto químico muy corta duración, puede ser o bien hidrolizado irreversiblemente a ácido O₂,3-dicetogulónico o ser reciclado a AsA por la acción de la DHAR. La DHAR es una enzima tiólica monomérica que se encuentra en diferentes compartimentos (cloroplastos y citosol) y juega un papel importante en respuesta a estreses abióticos, así como en procesos de crecimiento y desarrollo. (Pandey et al, 2015).

- Glutación reductasa (GR).

El GSH se oxida a GSSG cuando participa en ciclos de oxidación-reducción ya sean enzimáticos, como no enzimáticos. En el ciclo AsA-GSH, el GSH se oxida en una reacción catalizada por la DHAR. La glutación reductasa (GR) es una enzima dependiente de NAD(P)H que cataliza la reducción de GSSG a GSH y, así permite a la célula mantener una proporción GSH/GSSG alta. La GR pertenece a un grupo de flavoenzimas presente tanto en procariotas como eucariotas y contiene un grupo disulfuro esencial (Ghisla y Massey, 1989). A pesar de que se encuentra tanto en cloroplastos como en citosol, mitocondrias y peroxisomas, aproximadamente el 80% de la actividad de la GR en los tejidos fotosintéticos se produce a partir de isoformas cloroplásticas (Edwards et al., 1990).

Diferentes trabajos demuestran la modulación de la expresión de distintas isoformas de la GR y aumento de su actividad en respuesta a distintos estreses ambientales (Pandey et al, 2015).

2.3.2. Sistemas no enzimáticos

Los componentes no enzimáticos del sistema de defensa antioxidante incluyen: ascorbato (AsA) y glutación (GSH), así como el tocoferol, los carotenoides y los compuestos fenólicos. Éstos interactúan con numerosos componentes celulares y juegan un papel crucial como cofactores enzimáticos, influenciando desde la mitosis y la elongación celular, hasta la senescencia y muerte celular (De Pinto y De Gara, 2004).

Las plantas con mutaciones que provocan disminución en componentes antioxidantes no enzimáticos son, como es previsible, hipersensibles al estrés (Gao y Zang, 2008; Semchuk et al., 2009).

a) Ascorbato

El ascorbato (AsA) es el antioxidante más abundante de bajo peso molecular, y tiene un papel clave en la defensa contra el estrés oxidativo causado por un aumento en los niveles de ROS. El AsA es un potente antioxidante debido a su capacidad para donar electrones en reacciones enzimáticas y no enzimáticas. Interviene en diferentes procesos fisiológicos en las plantas, incluyendo crecimiento, diferenciación y metabolismo. Se encuentra en la mayoría de los tipos celulares, orgánulos y apoplasto vegetal (Shao et al., 2008), y se ha observado que es particularmente abundante en tejidos fotosintéticos (Smirnoff et al., 2004). La mayor parte del AsA, hasta el 90%, se localiza en el citoplasma, pero, a diferencia de otros antioxidantes solubles, una parte se exporta al apoplasto, donde está presente en concentración milimolar. Se cree que el AsA apoplástico puede representar la primera línea de defensa contra oxidantes externos potencialmente dañinos (Barnes et al., 2002). El AsA protege del daño oxidativo macromoléculas críticas. En condiciones fisiológicas normales, el AsA se encuentra principalmente en estado reducido en el cloroplasto (Smirnoff, 2000). Proporciona protección directa a la membrana, al reaccionar con el O_2^- y el H_2O_2 , y preserva las actividades de las enzimas que contienen iones metálicos (Noctor y Foyer, 1998). El AsA tiene un papel clave en la eliminación de H_2O_2 a través del ciclo ASA-GSH (Pinto et al., 2003) y en el mantenimiento de la homeostasis redox durante los estreses oxidativos (Moucheshi et al., 2014). Los niveles de AsA varían en respuesta a diversos estreses (Hernández et al., 2001; Sharma y Dubey, 2005; Maheshwari y Dubey, 2009; Radyuk et al., 2009; Mishra et al., 2011; Srivastava y Dubey, 2011). La sobreexpresión de las enzimas que participan en la biosíntesis de AsA confiere una mayor tolerancia al estrés abiótico en las plantas. Se ha demostrado que una mayor concentración de AsA confiere tolerancia al estrés oxidativo.

b) Glutación

El tripéptido glutación (γ -glutamyl-cisteinil-glicina, GSH) es uno de los principales tioles no protéicos de bajo molecular implicado en la defensa contra el daño oxidativo intracelular inducido por ROS. El glutión se encuentra principalmente en su forma reducida, GSH, y se localiza en todos los compartimentos celulares: citosol, cloroplastos, retículo endoplásmico, vacuolas, mitocondrias, peroxisomas y apoplasto (Moucheshi et al., 2014). Está implicado en muchos procesos fisiológicos (Noctor y Foyer, 1998; Gill y Tuteja, 2010). El equilibrio entre la forma reducida (GSH) y oxidada (glutación disulfuro, GSSG) es clave para el mantenimiento del estado redox celular. La función del GSH como un antioxidante es muy variada. Puede reaccionar químicamente con O_2^- , $\bullet OH$ y H_2O_2 y, por lo tanto, puede funcionar eliminar directamente las ROS. Puede participar en la regeneración de otros antioxidantes como el AsA, a través del ciclo de ASA-GSH. La generación y mantenimiento de la forma reducida es de vital importancia para la célula. Cuando el estrés aumenta, las concentración de GSH disminuye, aumentando la forma GSSG lo que provoca la degradación del sistema (Tausz et al., 2004).

c) Tocoferoles.

Los tocoferoles (α , β , γ , y δ) son un grupo de antioxidantes lipofílicos que eliminan ROS y radicales lipídicos, se consideran los antioxidantes protectores de la estabilidad de las membranas (Gill y Tuteja, 2010). Los tocoferoles son sintetizados solamente por los organismos fotosintéticos y están presentes sólo en las partes verdes de las plantas, se localizan en las membranas tilacoidales del cloroplasto, protegiendo así la estructura y función del PSII (Ivanov y Khorobrykh, 2003). La regeneración del tocoferol oxidado a su forma reducida se puede lograr por AsA, GSH (Fryer, 1992) o coenzima Q (Kagan et al., 2000). Se ha demostrado que la acumulación de α -tocoferol induce la tolerancia al diversos estreses (Yamaguchi-Shinozaki y Shinozaki, 1994; Bafeel e Ibrahim, 2008).

d) Carotenoides.

Los carotenoides, también denominados tetraterpenoides, son pigmentos orgánicos que pertenecen al grupo de los antioxidantes lipófilos y son capaces de detoxificación de diversas formas de ROS (Young, 1991). Además de intervenir en los procesos de fotosíntesis, formando parte del sistema fotosintético de la planta, son los responsables de los procesos de fotoprotección del aparato fotosintético. Intervienen en muchas funciones celulares incluyendo la tolerancia al estrés oxidativo. Los carotenoides también son precursores de moléculas de señalización que influyen en el desarrollo de la planta y las respuestas al estrés biótico/abiótico (Waskiewicz et al., 2014).

e) Compuestos fenólicos.

Los compuestos fenólicos son una serie de metabolitos secundarios que poseen propiedades antioxidantes, siendo abundantes en los tejidos vegetales (Grace y Logan, 2000). Los polifenoles contienen un anillo aromático con uno o varios -OH o -OCH₃ que contribuyen a su actividad biológica, incluyendo su acción antioxidante. Se han demostrado que, debido a su gran capacidad de donar electrones o átomos de hidrógeno, superan en actividad antioxidante a AsA y α -tocoferol. Los polifenoles pueden quelar iones metálicos, pueden eliminar recoger directamente ROS y pueden inhibir la peroxidación lipídica atrapando el radical alcoxilo. También disminuyen la fluidez de las membranas, lo que podría dificultar la difusión de los radicales libres y restringir reacciones peroxidativas. Hay evidencia de la inducción del metabolismo fenólico en plantas como respuesta a múltiples estreses (Michalak, 2006).

Dentro de los compuestos fenólicos hay una familia que cobra una gran importancia en la respuesta antioxidante frente a situaciones de estrés en plantas, los fenilpropanoides (PPs). Los PPs se forman a partir de desaminación de fenilalanina a ácido cinámico, catalizado por fenilalanina amonio-liasa (PAL), una familia de enzimas con diferentes isoformas que responden a diferentes estímulos medioambientales. Muchos de los compuestos fenólicos producidos por las plantas (flavonoides, isoflavonoides, cumarinas y lignanos) son productos secundarios del metabolismo de los PPs. Por ejemplo, tanto el resveratrol como los flavonoides provienen de una vía

biosintética común del ácido shikímico. El resveratrol es una fitoalexina usada por las plantas para protegerse de los hongos. Los flavonoides pueden interaccionar con otros antioxidantes fisiológicos como el AsA y los tocoferoles, amplificando sus efectos (Kasote et al., 2015). Las ligninas son polímeros fenólicos que desempeñan un papel clave en la reducción de la permeabilidad de la pared celular, aumentando su rigidez, que es una parte clave del mecanismo de resistencia a patógenos. Flavonoides y PPs pueden ser oxidados por las peroxidasas, por lo que actúan eliminando H_2O_2 . Peroxidasas de la pared celular catalizan la oxidación de PPs a sus radicales fenoxilo, posteriormente se polimerizan resultando una gran diversidad estructural de ligninas naturales (Korkina y Afanas'ev, 1996). Hay gran cantidad de referencias al papel que desempeñan los PPs y sus formas glicosidadas (PPGs), como antioxidantes, al igual que otros polifenoles vegetales. Este rol lo pueden desempeñar ya sea por la eliminación directa de especies reactivas de oxígeno, o actuando como radical peroxilo.

2.4. Las ROS y el daño oxidativo a las biomoléculas.

La producción y la eliminación de las ROS deben ser controladas de forma estricta, con el fin de evitar el estrés oxidativo. Cuando el nivel de ROS excede los umbrales que se consideran tolerables para constituir un mecanismo de defensa, se dice que la célula pasa a estar en un estado de estrés oxidativo. El equilibrio entre la producción y la eliminación de las ROS se altera como consecuencia del estrés tanto abiótico como biótico. Niveles elevados de ROS pueden causar daño a biomoléculas, modificando ácidos grasos poliinsaturados (PUFAs), proteínas, DNA y carbohidratos (figura 16), y, en última instancia, provocar la muerte celular.

2.4.1. Ácidos grasos poliinsaturados (PUFAs).

Los principales PUFAs de las membranas vegetales son el ácido linoleico y linolenico. Estos PUFAs son susceptibles al ataque por singlete de oxígeno y el radical hidroxilo formándose hidroperóxidos de lípidos. La peroxidación de los lípidos provoca la disminución de la fluidez de las membranas y, de forma secundaria, provoca el daño

de proteínas de membrana. Como resultado de la peroxidación lipídica se forman varios aldehídos como HNE (4-hidroxi-2-nonenal) y MDA (malondialdehído) así como hidroxiilos y ceto ácidos grasos. Los productos derivados de estos aldehídos pueden reaccionar con DNA y proteínas. El nivel de peroxidación de lípidos se ha utilizado ampliamente como un indicador de daño inducido por ROS en las membranas celulares bajo condiciones de estrés (Sharma y Dubey, 2005; Han et al., 2009; Tanou et al., 2009; Mishra et al., 2011). El MDA es responsable de daños de la membrana celular (Halliwell y Gutteridge, 1999).

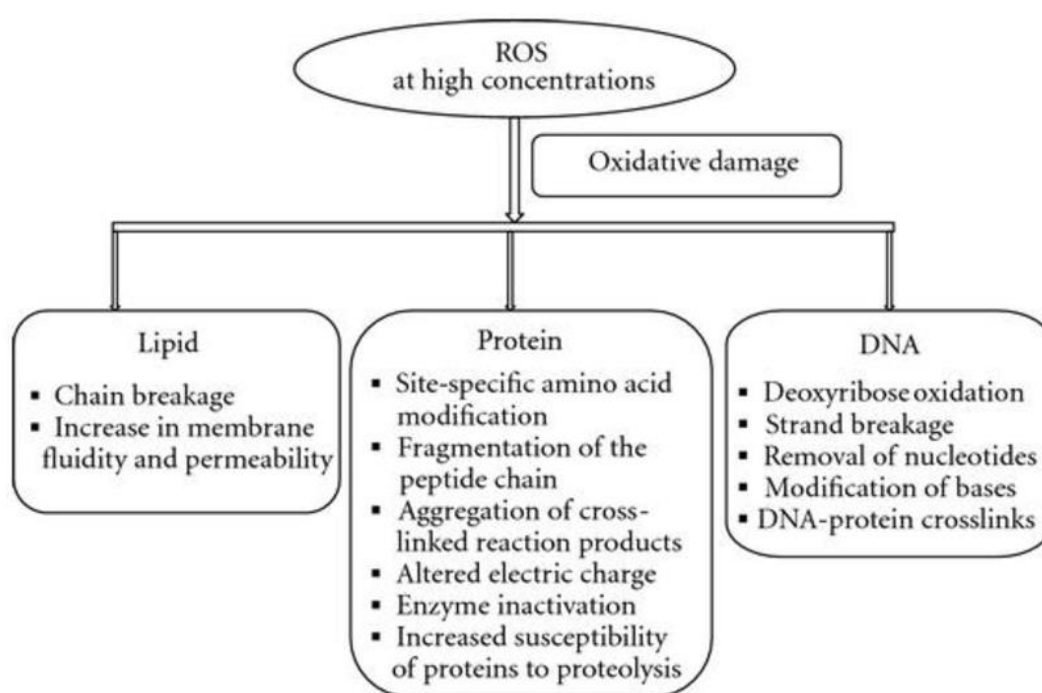


Figura 16. Daños inducidos por choque oxidativo de ROS en lípidos, proteínas y ADN. (Sharma et al., 2012).

2.4.2. Proteínas.

El ataque de las ROS puede causar una gran variedad de modificaciones en las proteínas, tanto directas como indirectas. Las modificaciones directas implican la modulación de la actividad de las proteínas a través de procesos de nitrosilación, carbonilación, formación de enlaces disulfuro, oxidación del triptófano y glutatiónilación. Entre las modificaciones indirectas, la principal es la conjugación con

los productos de la peroxidación de ácidos grasos (Yamauchi et al., 2008). Los tejidos dañados por estrés oxidativo contienen generalmente altas concentraciones de proteínas carboniladas, que son ampliamente utilizadas como marcador de la oxidación de una proteína (Moller y Kristensen, 2004). La modificación de proteínas ha sido reportado en plantas bajo diferentes estreses (Romero-Puertas et al., 2002). Los aminoácidos en un péptido se diferencian en función de su susceptibilidad al ataque de las ROS. Por ejemplo, los grupos tiol y azufre que contienen los aminoácidos son muy sensibles al ataque por ROS. El oxígeno activado puede desencadenar la formación de puentes disulfuro. El oxígeno también se puede añadir a una metionina para formar sulfóxido de metionina (Brot y Weissbach, 1982). La oxidación de los centros de hierro-azufre por el O_2^- , a través de una reacción de Fenton, es irreversible, y conduce a la inactivación enzimática (Brot y Weissbach, 1982). Las proteínas oxidadas sirven como sustratos para la digestión proteolítica. Se ha sugerido que la oxidación de proteínas podría predisponerlas a la ubiquitinación, que, a su vez, las convertiría en un objetivo para la degradación proteasomal (Cabisco et al., 2000).

2.4.3. ADN.

Las ROS son una causa importante de daño en el ADN (Imlay y Linn, 1988). Se ha observado que pueden causar daños oxidativos al ADN nuclear, mitocondrial y cloroplástico. Cualquier daño al ADN puede resultar en cambios en la codificación de proteínas, que pueden llevar a un mal funcionamiento o inactivación completa de las proteínas. El ataque oxidativo en el ADN resulta en la oxidación de la desoxirribosa, en rotura de cadenas, en la eliminación de los nucleótidos, en una gran variedad de modificaciones en las bases de los nucleótidos, y en reticulaciones de las proteínas del ADN. Además, los cambios en los nucleótidos de una cadena pueden resultar en desajustes en los nucleótidos de la otra cadena, produciendo mutaciones posteriores. La degradación del ADN se ha observado en plantas expuestas a diversos estreses ambientales como salinidad y toxicidad a metales (Liu et al., 2000). El ataque oxidativo a las bases de ADN en general, implica la adición de $\bullet OH$ a los dobles enlaces, mientras que los daños sobre los azúcares principalmente son resultado de la sustracción de

hidrógeno a partir de la desoxirribosa (Dizdaroglu, 1993). El radical hidroxilo puede reaccionar con todas las bases de purina y pirimidina y, también, con la columna vertebral de desoxirribosa (Halliwell y Gutteridge, 1999). El $^1\text{O}_2$ sólo reacciona con la guanina, mientras que el H_2O_2 y el O_2^- no reaccionan con ninguna base (Halliwell y Arouma, 1991). Los daños inducidos por las ROS en el ADN incluyen varias alteraciones mutagénicas. Las bases del ADN también pueden sufrir ataques indirectos a través de productos reactivos generados por la acción de las ROS sobre otras macromoléculas tales como lípidos (Fink et al., 1997). El ADN mitocondrial y cloroplástico son más susceptibles al daño oxidativo que el nuclear, debido probablemente a la ausencia de histonas, que proporcionan cierta protección frente a ataques oxidativos, y también por encontrarse más cerca de los sistemas de producción de ROS (Richter 1992). A pesar de existir numerosos sistemas de reparación del ADN dañado, la excesiva cantidad de cambios causados por ROS puede conducir a un daño permanente en el ADN, con efectos potencialmente perjudiciales para la célula.

2.4.4. Carbohidratos.

El radical hidroxilo puede reaccionar con carbohidratos libres, esto, a menudo, libera ácido fórmico como principal producto (Moller et al., 2007). Los polisacáridos de las paredes celulares también son susceptibles a la ruptura oxidativa por el radical hidroxilo “in vitro” bajo condiciones fisiológicas (Fry, 1998)

Objetivo

El objetivo general de esta Tesis Doctoral es conocer mejor cómo afecta la variedad (Manzanilla, Morisca), las condiciones de cultivo (secano, regadío) y el estado de maduración (verde, envero, maduro) durante tres campañas consecutivas (2011, 2012 y 2013) a una serie de características fisiológicas que influyen en la calidad de las aceitunas.

Para lograr este objetivo general se han planteado una serie de objetivos parciales:

- Determinar, en todos los casos, el peso y contenido en aminoácidos y proteínas totales.
- Determinar, en todos los casos, una serie de actividades enzimáticas oxidantes (oxidación NADH, producción de O_2^- y actividad PPO) y antioxidantes (SOD, POD), así como el poder antioxidante total (FRAP).
- Determinar, en todos los casos, el contenido total en compuestos fenólicos, flavonoides y fenilpropanoides glicosidos.
- Establecer un marco estadístico que permita, en un escenario de múltiples factores interrelacionados y muy variables (variedad, condición de cultivo, estado de maduración, años), la identificación del factor o factores más decisivos a la hora de determinar las características del fruto.

Material y Métodos

1.- Material Vegetal

Se utilizan aceitunas de las variedades Manzanilla de Sevilla y Morisca cultivadas en la localidad de Ribera del Fresno (Badajoz), bajo dos regímenes hídricos diferentes: condiciones de secano y de riego, durante los años 2011, 2012 y 2013. Las aceitunas utilizadas en el presente estudio se han agrupado bajo tres estados de maduración: E1 (verde, que se corresponde con aceitunas con índice de madurez (IM) entre 0 y 1), E2 (manchada, que se corresponden con aceitunas con un IM entre 2 y 3) y E3 (madura, que se corresponden con un IM 4 o superior). Las fechas de recolección para cada estado son las siguientes, E1: desde final de agosto a final de septiembre para los tres años estudiados; E2: desde principio de octubre a final de noviembre para los años 2011 y 2012 y desde final de octubre mediados de noviembre para el año 2013 y E3: final de diciembre para el año 2011, final de noviembre para el año 2012 y entre mediados y final de noviembre para el año 2013; las del año 2011 recogidas en diciembre presentan un estado de madurez algo superior al estado E3 de otros años, así en 2011 el estado E3 se corresponden con IM de aproximadamente 6, en 2012 IM entre 4 y 5 y en 2013 con IM 4.

Descripción de las parcelas de cultivo

Las parcelas de cultivo se corresponden ambas a olivos de las variedades Manzanilla de Sevilla y Morisca, situadas de forma alternada, siendo una de regadío y otra de secano y con sistema de poda tradicional. Los muestreos se realizan entre los años 2011 y 2013, abarcando por tanto tres campañas oleícolas.

Ambas parcelas se encontraban en condiciones de no laboreo con maleza controlada con herbicidas post-emergencia, Están localizadas en la localidad de Ribera del Fresno (Badajoz), y pertenecen a D. Victoriano Sayago, Gerente de la Sdad. Coop. Olivareros y Viticultores de Ribera del Fresno (Montaño, 2016). A continuación se recogen algunas características de los olivares estudiados.

Parcela Olivar de Regadío (figura 17):.

Coordenadas UTM: X=740858,91; Y= 4269391

Superficie: 2,33 ha, Nº de olivos: 587, Edad: 20 años

Marco de plantación: 6 m x 6 m

El riego ha sido aplicado atendiendo a las necesidades teórica de los mismos y determinada por la ATRIA del olivar de la cooperativa.



Figura 17. Imágenes de la parcela de olivar de regadío seleccionada en Ribera del Fresno.

Parcela Olivar de Secano (figura 18):

Coordenadas UTM: X=738447,19; Y= 4266914,53

Superficie: 0,84 ha, Nº de olivos: 160, Edad: 25 años aproximadamente

Marco de plantación: Tresbolillo irregular.



Figura 18. Imagen de la parcela de olivar de secano seleccionada en Ribera del Fresno.

En la tabla 4 se muestran las características de los suelos de ambas parcelas. Las diferencias entre ambas vienen dadas principalmente por la diferente orografía del terreno y del riego. Además, en la tabla se incluye un seguimiento de la nutrición foliar

de los olivos durante los tres años de estudio sin que en ninguno se detectara deficiencia o toxicidad de algún elemento.

Tabla 4. Caracterización físico-química de los suelos de las parcelas de los olivares estudiados y seguimiento de la nutrición foliar de los olivos durante los tres años de estudio (Montaño, 2016).

	Parcela de Regadío	Parcela de Secano
pH	7,2	7,9
Conductividad	339,2	238,8
N (%)	0,13	0,03
Relación C/N	3,5	7,3
P (ppm)	66,8	12,6
Cationes de intercambio (meq/100 g)		
K	0,24	0,27
Ca	14,27	243,02
Mg	4,34	3,65
Na	0,39	0,33
Materia orgánica (%)		
C org, Oxidable	0,46	0,22
Mat, Org, Oxidable	0,79	0,38
Mat, Org, Total	1,02	0,50
Oligoelementos (ppm)		
Cu	9,4	5,49
Fe	26,0	5,4
Mn	68,7	4,2
Zn	1,8	1,3
B	3,2	0,7
TEXTURA (%)		
Tipo textura	Franco arcilloso	Franco arcilloso
Arena	53,1	61,1
Limo	21,3	16,0
Arcilla	25,6	22,9

La elección de los olivos a muestrear es al azar, salvo los olivos que presentaban un desarrollo deficiente que se descartan.

La característica climática de la zona es mediterránea con influencia atlántica por su cercanía al oeste con el océano atlántico. En la tabla 5 se indican los valores medios de Temperatura media, Temperatura máxima, Temperatura mínima, Precipitación y Evapotranspiración mensuales de las tres campañas objeto de este estudio.

Durante las tres campañas la Temperatura media es de 16,3 °C, estando la media de las temperaturas mínimas entre 9,5 y 10,5 °C y la media de las máximas entre 22,3 y 23,3 °C. Las precipitaciones medias de las tres campañas son 383,3 mm, siendo el año 2013 ligeramente más lluvioso. En esta localización son muy poco frecuentes las lluvias en el mes de Julio, Las precipitaciones son más frecuentes en los meses de Noviembre y Diciembre.

2.- Determinación del peso seco, Contenido en aminoácidos solubles y proteínas

La determinación de la relación peso seco/peso fresco (PS/PF) se realiza pesando la pulpa de aceitunas (peso fresco), posteriormente, se seca en una estufa a 90 °C durante 24 horas, transcurrido este tiempo se estima el peso seco.

Tanto el contenido en aminoácidos solubles como en proteínas, se basa en la reacción colorimétrica desarrollada por el reactivo de ninhidrina para los aminoácidos (Yemm y Cocking, 1955) y el azul de Coomassie para las proteínas (Bradford, 1976).

La pulpa de aceitunas se homogeniza en tampón fosfato sódico 50 mM; pH 7,0 (0,2 g mL⁻¹), se filtra con filtro de muselina y se centrifuga a 12.360 g durante 15 min, el sobrenadante se usa para la determinación de aminoácidos y proteínas.

Para la determinación de aminoácidos se mezclan 100 µL de sobrenadante con 1,5 mL de reactivo de ninhidrina (80 g de cloruro de estaño disuelto en 50 mL de tampón citrato sódico 200 mM, pH 5,0 + 2 g de ninhidrina disueltos en 50 mL de etilenglicol), se incuba durante 20 min a 100 °C, se enfría la mezcla y se le añaden 8 mL de propanol al 50%, se mantiene a temperatura ambiente durante 30 min y se mide la absorbancia a 570 nm. La concentración de aminoácidos se expresa en mg por gramo de peso fresco (mg g⁻¹ PF) frente a una curva patrón de glicina.

Tabla 5. Temperaturas medias (máximas, mínimas y media), precipitación y evapotranspiración (ETo) mensual durante 2011, 2012 y 2013 en las parcelas estudiadas (Estación meteorológica de Villafranca de los Barros, Badajoz). Resaltado en diferente color el periodo de cuajado y engorde de la aceituna (de julio a diciembre).

	2011	2012	2013	2011	2012	2013	2011	2012	2013	2011	2012	2013	2011	2012	2013
	Tª máx (°C)			Tª mín (°C)			Tª media (°C)			Pluviometría (mm)			Eto (mm)		
Enero	12,26	14,23	13,06	4,17	1,26	4,57	7,93	6,93	8,55	33,60	15,64	40,60	31,12	35,64	32,46
Febrero	15,85	14,52	13,10	3,74	-1,04	2,51	9,37	6,47	7,62	27,80	1,19	77,00	53,22	63,51	46,31
Marzo	16,63	20,27	15,07	6,30	5,44	6,97	11,26	12,82	10,69	57,34	2,18	104,20	75,99	108,60	66,19
Abril	23,61	17,13	20,19	10,94	6,86	7,55	17,31	11,83	14,22	37,82	53,86	23,60	121,95	99,10	114,47
Mayo	26,88	27,20	23,49	13,70	12,87	9,39	20,31	20,19	16,61	23,96	20,99	16,40	153,94	171,95	154,34
Junio	30,83	31,27	29,09	14,70	15,53	14,23	23,10	23,50	22,05	6,73	0,00	10,80	197,24	205,86	182,57
Julio	32,99	33,85	34,72	16,66	16,41	18,20	25,01	25,50	26,90	0,00	0,00	0,80	223,70	225,34	216,96
Agosto	32,90	34,37	34,83	17,47	17,30	18,21	25,08	25,91	26,76	21,38	0,00	1,60	185,62	197,33	195,12
Septiembre	30,29	29,00	30,40	15,07	15,63	16,47	22,66	22,30	23,41	11,29	31,50	12,00	132,39	127,17	138,23
Octubre	26,56	22,23	23,57	12,08	11,16	11,70	19,13	16,44	17,39	59,80	84,60	68,20	99,82	77,51	79,52
Noviembre	16,95	15,68	15,40	7,73	7,57	4,03	11,92	11,43	9,34	64,35	148,20	4,60	45,21	36,95	39,83
Diciembre	13,28	13,71	14,51	3,13	4,59	2,75	7,57	8,78	8,05	10,49	32,60	44,60	28,60	27,17	36,34
Media Tª	23,25	22,78	22,28	10,47	9,46	9,71	16,70	16,00	15,96						
Pluviometría Total										354,56	390,76	404,40			
ETo													1348,80	1376,13	1302,34

Para la determinación de proteínas se mezclan 50 μ L o 100 μ L de extracto con 200 μ L de reactivo Bradford, y se completa hasta 1 mL con H₂O destilada. Se incuba a temperatura ambiente durante 30 min y se mide la absorbancia a 595 nm. Se expresa como mg de proteínas por gramo de peso fresco frente a una curva patrón de sero albúmina bovina.

3.- Medida de Actividades Enzimáticas

Para la determinación de la oxidación de NADH, generación de O₂⁻, actividades peroxidasa (POD) y superóxido dismutasa (SOD), la pulpa de aceitunas se homogeniza a 4 °C en tampón fosfato sódico 50 mM; pH 6,0; 0,5 mM PMSF (Fluoruro de fenil metilsulfonilo), 1 g L⁻¹ PVPP (Polivinilpolipirrolidona) y 1 mM β - Mercaptoetanol, La proporción es 0,5 g mL⁻¹. El homogenizado se filtra a través de un filtro de muselina y se centrifuga a 39.000 g durante 30 min a 4 °C. El pellet se deshecha y el sobrenadante se usa inmediatamente para las medidas.

Para la determinación de la actividad Polifenoloxidasas (PPO) se homogeniza la pulpa de aceitunas en tampón fosfato sódico 100 mM; pH 7,0; 1% PVPP (0,15 g mL⁻¹); el homogenizado se filtra con un filtro de muselina y se centrifuga a 12.000 g 15 min, el sobrenadante se usa inmediatamente para la medida.

El contenido en proteínas se determina mediante el método Bradford (Bradford, 1976).

3.1.- Actividad de Oxidación de NADH

La oxidación de NADH se determina espectrofotométricamente, mediante la disminución de la absorbancia a 340 nm (Rubinstein et al., 1984), durante 3 min, en un medio de reacción con 300 μ M NADH en 50 mM tampón fosfato sódico pH 6,0 y solución enzimática, la actividad se expresa como nmoles NADH oxidado min⁻¹ mg⁻¹ prot (coeficiente de extinción, 6,3 mM⁻¹ cm⁻¹),.

3.2.- Generación de $O_2^{\cdot-}$

La generación de $O_2^{\cdot-}$ se mide espectrofotométricamente mediante el método de reducción de epinefrina a adrenocromo a 480 nm durante 3 min (Misra y Fridovich, 1972). El medio de reacción contiene 1 mM de epinefrina en de tampón acetato sódico 25 mM pH 5,0 y solución enzimática. El coeficiente de extinción es $4.020 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$, La generación de $O_2^{\cdot-}$ se expresa como nmoles de adrenocromo $\text{min}^{-1} \text{ mg}^{-1} \text{ prot.}$

3.3.- Actividad Superóxido Dismutasa (SOD)

El método usado para la medida de la actividad SOD se basa en la inhibición de la reducción del compuesto azul de nitrotetrazolio (NBT). Cuando se ilumina riboflavina, en presencia de oxígeno y con un donador de electrones (como la metionina), se genera aniones superóxidos los cuales reducen al NBT hasta formazán. Esta reducción se mide 560 nm. Una unidad de SOD se define como la cantidad de enzima requerida para provocar una inhibición del 50 % de la reducción de NBT (Rukmini et al., 2004).

El procedimiento adoptado es el descrito por Beauchamp y Fridovich (1971). La mezcla de reacción contiene tampón fosfato sódico 50 mM; pH 7,8; 0,1 mM EDTA; 1,3 μM riboflavina; 13 mM metionina y 63 μM NBT. La actividad SOD se expresa como U SOD $\text{mg}^{-1} \text{ prot.}$

3.4.- Actividad Peroxidasa (POD)

La actividad POD se mide según Ngo y Lenhoff (1980) en un medio de reacción que contiene 3,3 mM DMAB (ácido 3-dimetilaminobenzoico) y 66,6 μM MBTH (3-metil- 2-benzotiazolinona hidrazona clorhidrato) en tampón fosfato sódico 50 mM pH 6,0 y solución enzimática. El coeficiente de extinción es $47,6 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$. La actividad POD se mide como aumento de la absorbancia a 590 nm debido a la formación del complejo DMAB-MBTH durante 3 min y se expresa como nmoles de DMAB-MBTH $\text{min}^{-1} \text{ mg}^{-1} \text{ prot.}$

3.5.- Actividad Polifenil oxidasa (PPO)

La actividad polifenol oxidasa (PPO, EC 1,14,18,1) se ha determinado de acuerdo a la metodología descrita por Thipyapong et al, (1995), espectrofotométricamente a

390 nm, en un medio de reacción que contiene 100 mM tampón fosfato sódico, pH 7,0, Triton X-100, 30 μ M ácido caféico y el extracto, a 30 °C. Se define una unidad de PPO como la cantidad de enzima necesaria para producir en el medio de reacción un incremento en la absorbancia a 390 nm de 0,001 U min⁻¹ mg⁻¹ prot.

4.- Análisis bioquímicos de componentes fenólicos

Para realizar estos análisis se homogenizan 1 g de pulpa de aceitunas en 5 mL de metanol + 5 mL de cloroformo + 2,5 mL NaCl 1% (2:2:1), posteriormente el homogenizado se filtra con filtro de muselina y se centrifuga a 3.200 g durante 10 min. Se separa la fase metanólica donde se cuantifican los diferentes componentes fenólicos.

4.1.- Determinación fenoles totales

Se toman 150 μ L de homogenizado, se le añade 450 μ L de Na₂CO₃ al 2 %, 150 μ L de reactivo Folin-Ciocalteu al 50 % y 825 μ L de agua destilada. La mezcla de reacción se incuba durante 60 min a temperatura ambiente (Rivero et al., 2001). El contenido se cuantifica mediante la medida de la absorbancia a 765 nm. Los resultados se expresan en μ g de ácido caféico g⁻¹ PF, a partir de una curva patrón.

4.2.- Determinación de flavonoides totales

El contenido en flavonoides se mide mediante el método colorimétrico de Kim et al., (2003). Se toman 200 μ L de homogenizado, al que se le añade 800 μ L de agua destilada y 60 μ L de NaNO₂ al 5% se incuban las muestras 5 min a temperatura ambiente en oscuridad; posteriormente se añaden 60 μ L de una solución de AlCl₃ al 10% y 400 μ L de solución de NaOH 1 M, se agita e incuba a temperatura ambiente y en oscuridad durante 15 min. La absorbancia se mide a 415 nm y el contenido de flavonoides se calcula usando una curva patrón de rutín. Los datos se expresan como μ g rutín g⁻¹ PF.

4.3.- Determinación Fenilpropanoides glicósidos totales (PPGs)

La determinación se realiza de acuerdo al método colorimétrico basado en la estimación de derivados del o-dihidroxicinámico por la reacción de Arnow (Arnow, 1937). Se mezclan: 150 μL de homogenizado con 300 μL de HCl 0,5M; 300 μL de una solución de NaNO_3 al 10 % y $\text{Na}_2\text{MoO}_4 + 2 \text{H}_2\text{O}$ al 10 % (reactivo Arnow), 300 μL de NaOH 2 mM y 450 μL de agua destilada, Tras 10 min a temperatura ambiente, la absorbancia se mide a 525 nm y el contenido en PPGs se expresa como μg verbascosido g^{-1} PF frente una curva patrón realizada con una solución madre de 3-(3,4-dihydroxyphenyl)-L-alanina (Gálvez et al., 2005).

5.- Medida de actividad antioxidante total: Ensayo FRAP (Ferric Reducing Ability of Plasma)

Este ensayo se basa en la reducción del complejo amarillo Fe^{3+} -TPTZ a un complejo de color azul Fe^{2+} -TPTZ por sustancias donadoras de electrones bajo condiciones ácidas (Rice-Evans, 2000). El ensayo se realiza con el reactivo FRAP: 1 mM 2,4,6-tripiridil-2-triazina (TPTZ) y 20 mM de FeCl_3 en 0,25 mM de CH_3COONa pH 3,6. El extracto se obtiene mediante la homogenización de 1 g de pulpa de aceitunas en 10 mL de metanol, filtrado mediante un filtro de muselina y centrifugado a 10.000 g durante 2 minutos. A 10 μL de extracto se le añaden 1500 μL de reactivo FRAP, la mezcla se incuba a temperatura ambiente durante 5 min y se mide la absorbancia a 593 nm. La actividad antioxidante se expresa como μg FeSO_4 g^{-1} PF frente a una curva patrón de sulfato ferroso (Benzie y Strain, 1996).

6.- Análisis Estadístico

6.1.- Comparación de datos

En cada muestreo se toman 100 aceitunas de los mismos individuos seleccionados en cada una de las parcelas objeto de estudio. Los datos son medias de 10 repeticiones, cada una de ellas realizada por triplicado para cada uno de los muestreos. Los valores obtenidos son analizados mediante una t-Student para comparar variedades y condiciones de riego, mientras que para los diferentes estados de maduración se aplicó una ANOVA con test post-hoc de Duncan.

6.2.- Descripción del método MDS-PTA para el análisis de tablas de tres vías

Para el análisis de los resultados se propone una alternativa al método CA-PTA (Cluster Analysis-Partial Triadic Analysis) usado recientemente por otros autores como Gourdol et al, (2013) y Darwiche-Criado et al, (2015) para evaluar datos ambientales agrupados en tablas de tres vías.

La propuesta es reemplazar el CA (Cluster Analysis) por MDS (Multidimensional Scaling). Ambos métodos tienen en común que permiten identificar grupos de individuos disimilares entre ellos, pero de mayor similitud dentro de cada grupo. La principal diferencia radica en cómo se presentan esas agrupaciones y lo que ello implica. El resultado del CA es un árbol jerarquizado o dendrograma mientras que en el caso MDS es una representación en un plano cartesiano de los individuos, más cercano un punto de otro en función del parecido. Cuanto más similares menor será la distancia entre ellos, por lo que aparecen en el plano como puntos próximos. Y es esta proximidad lo que permite identificar los grupos. Es precisamente esta posibilidad de medir distancia lo que ofrece una ventaja del MDS respecto al CA. El CA muestra los individuos ordenados o jerarquizados dentro del dendrograma pero no existen coordenadas para medir la distancia que existe entre individuos y clusters con lo que decir si la diferencia entre ellos es mucha o poca.

Por lo que se podría decir que el CA-PTA es una herramienta de análisis cualitativa-cuantitativa mientras que el MDS-PTA es una herramienta cuantitativa-cuantitativa. Esta propiedad de medir la distancia/diferencias entre individuos lo que permite una nueva aproximación a la etapa de análisis interestructura del PTA (Partial

Triadic Analysis). Con ello lo que se busca es facilitar el análisis estadístico de este tipo de datos.

La hipótesis que avala esta aproximación del MDS al análisis interestructura es que si los casos son muy similares entre los diferentes casos de estudio, el valor del ángulo que se forma entre ellos en el análisis interestructura es bajo mientras que en el MDS no habría visualización de grupo correspondiente a cada caso ya que los individuos estarían entremezclados. A continuación se describen las dos técnicas por separado, PTA y MDS, y se finaliza con una propuesta de interpretación.

a) Análisis Triádico Parcial (Partial Triadic Analysis, PTA)

El Análisis Triádico Parcial (Partial Triadic Analysis, PTA) o X-STATIS (Abdi et al, 2012), es un método de análisis aplicable a conjuntos de matrices de tres entradas constituidas por los mismos individuos (en filas) y las mismas variables (en columnas), en varias condiciones u ocasiones. El método sigue el mismo esquema de STATIS, es decir, análisis de la interestructura, construcción y análisis del compromiso (Figura 19), y estudio de la intraestructura; pero a diferencia de STATIS, el PTA no utiliza operadores, sino que trabaja directamente con las matrices originales (Vicente-Galindo, 2013).

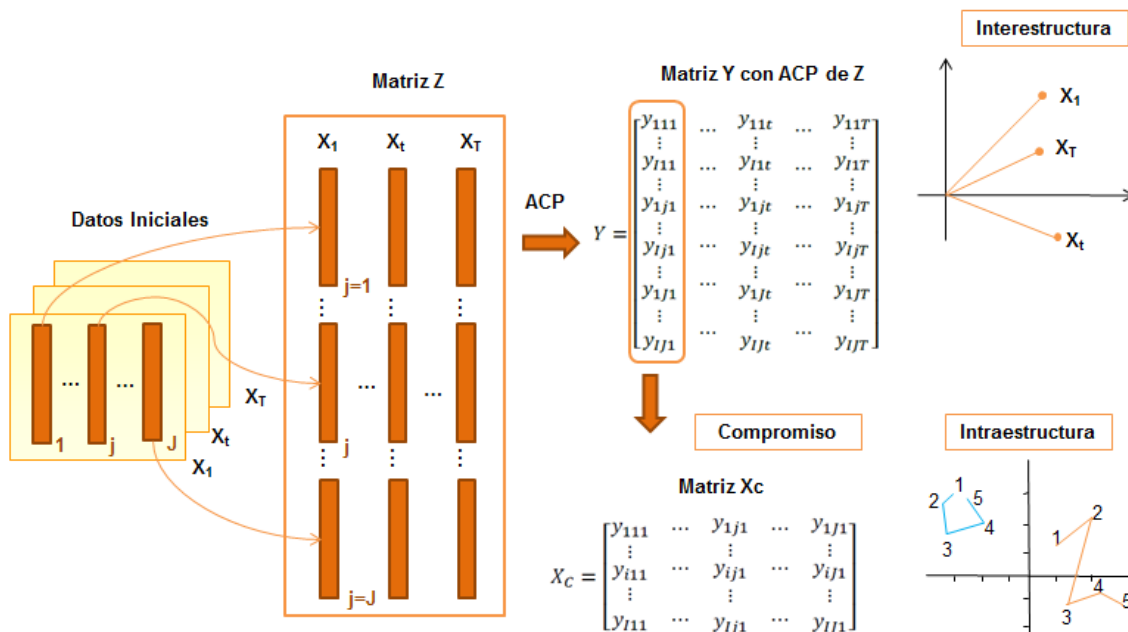


Figura 19. Metodología de PTA (Medina-Hernández, 2015).

Observando la figura 19, se observa una sucesión de análisis de componentes principales para pasar desde la T tablas iniciales a una única tabla Compromiso. Se puede observar además que en la etapa Interestructura, cada tabla es representada como un punto en el espacio unido vectorialmente con el origen. El ángulo que se forma entre ellos es una estimación del parecido.

Cuanto más pequeño sea el ángulo entre dos vectores (casos), más similares serán entre ellos, como se indica previamente, si los datos son muy similares entre las diferentes casos de estudio, el valor del ángulo que se forma entre ellos en el análisis interestructura es bajo, mientras que en el MDS no habría visualización de grupo correspondiente a cada caso ya que los individuos estarían entremezclados.

Según González-Bartolomé (2015), las posibles situaciones en la interestructura son las que se recogen en la Figura 20. En la situación (a) existe una estructura de las variables común a las tablas, la cual estará bien representada por la matriz compromiso. En la situación (b) la longitud de los vectores presentan órdenes de magnitud distintos, por lo que el compromiso no representará bien a todo el conjunto de tablas (sólo los objetos con normas más altas o vectores más largos contribuirán en la construcción del compromiso). En la situación (c) el objeto C1 presenta una estructura diferente a la del resto de tablas, contribuyendo poco en la determinación del compromiso. Por último, en la situación (d), todos los objetos son muy distintos, no existiendo una estructura común de las variables.

Si se observa de nuevo la figura 19, el siguiente paso es construir la matriz compromiso a partir de la primera columna de la matriz Y anterior, Esta matriz compromiso constituye un resumen global de toda la información que aportan las T tablas iniciales.

Por último está el estudio de la intraestructura (figura 19) que permite representar en el espacio (en un plano) la evolución o cambio que experimentan las variables o individuos a lo largo de las distintas T situaciones de estudio. Esto se conoce como estudio de las trayectorias. Si se observa esta paso en la figura 19, los individuos están unidos mediante segmentos. Si en la evolución de esa variable entre dos situaciones se observan segmentos o trayectos cortos indica un comportamiento homólogo (poco cambio en los valores). Cuando mayor sea la longitud del segmento entre situaciones de estudio mayor, mayor cambio ha habido entre las situaciones.

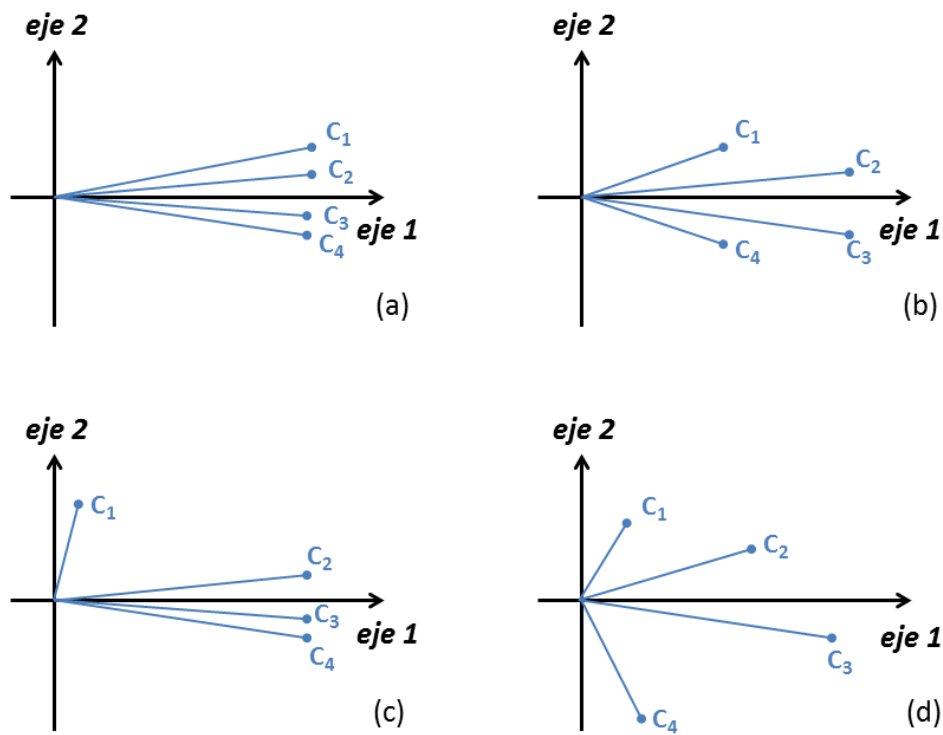


Figura 20. Tipos de interestructura (González-Bartolomé, 2015).

b) Multidimensional Scaling (MDS)

Para realizar el análisis MDS se requiere como punto de partida una matriz de similitud, una cuantificación del grado de parecido entre dos objetos, como es la distancia (euclídea). Cuanto mayor sea la distancia, mayor será la diferencia. Otras estimaciones de la similitud pueden ser empleadas, como el de coeficiente de correlación, que debe ser transformado a distancia.

El análisis MDS, al igual que el análisis de componentes principales, es una técnica de reducción de datos que es empleada como análisis exploratorio.

MDS es una familia de métodos que representan la estructura de los datos en forma espacial fácilmente asimilable por el ojo humano y permite encontrar el patrón del grado de parecido entre los diferentes objetos y poder interpretar la causa de la agrupación, cosa que en algunos casos el CA no facilita (Borg y Groenen, 2010).

Los métodos MDS utilizan algoritmos iterativos para encontrar las coordenadas de los objetos en el espacio de dimensión reducida. Uno de esos algoritmos para construir la matriz de proximidad es el PROXSCAL (PROXimity SCALing).

El resultado final del MDS es una representación de baja dimensión llamado espacio común (dos o tres dimensiones para definir un plano o un espacio) donde se representan el total de individuos que se han ubicado en el plano (o en el espacio si es necesario usar 3 dimensiones) agrupados por poseer características similares, es decir, que las variables que se han medio sobre ellos los hace similares o disimilares.

c) MDS-PTA y propuesta de interpretación

Gourdol et al. (2013) y Darwiche-Criado et al. (2015) utilizaron una combinación del PTA con el CA (CA-PTA) para explorar datos ambientales organizados en tablas de tres entradas. En particular, el análisis clúster fue usado para identificar la agrupación espacial de todas las muestras.

Pero, como se indica anteriormente, el CA puede presentar limitaciones que condicionen la adecuada elección de los casos de estudio o lo que se convertirá en la tercera vía para datos de tres entradas (un cubo de datos) y esto afectará al resultado del análisis.

Como una nueva alternativa al CA-PTA, se propone el MDS-PTA para el análisis de datos de tres entradas en la que el MDS es la etapa inicial en la que se identifica qué factor de estudio es el más idóneo para convertirse en la tercera vía o tercer nodo en el cubo de datos, para seguidamente aplicar un PTA.

En el caso del MDS-PTA se propone usar el análisis visual del *espacio común* (el espacio en baja dimensión donde es proyectado los individuos en términos de similitud) para identificar qué factor produce mayor homogeneidad, es decir, cuanto menor sea la apreciación de grupos más conveniente será ese factor para convertirse en una tercera vía de entrada en la cubo de datos y mejor representado quedarán los datos con el compromiso, al no forzar la “desaparición” de grupos distintos.

Además, se propone una nueva forma de interpretar los datos para un mayor entendimiento de la naturaleza de los datos y su información asociada. Esta es:

- Identificar y estudiar la similitud de los casos a través del resultado del MDS en lugar del interespacio (de esta manera se ahorra el paso de determinar la matriz de coeficiente de correlaciones vectoriales).
- Evaluar los individuos consensos o medios mediante la solución compromiso (espacio consenso del PTA).

- Analizar las variables e individuos mediante la intraespacio del PTA.

Software

Todos los análisis fueron realizados con el programa SPSS® vn 21,0 Statistics software package (SPSS Inc, Chicago, IL, USA).

Resultados y Discusión

1.- Obtención de datos directos

Tal y como se indica en el apartado anterior de Material y Métodos, en cada una de las tres campañas estudiadas (2011, 2012 y 2013) se recolectaron aceitunas en tres estados diferentes de maduración (E1, E2 y E3) de las dos variedades en estudio (Manzanilla y Morisca) procedentes de las dos parcelas estudiadas bajo dos condiciones de cultivo (secano -S- o regadío -R-).

De cada una de ellas se determinaron y midieron los siguientes parámetros: Peso fresco, peso seco, contenido en aminoácidos solubles y proteínas totales, la actividad de oxidación de NADH y producción de O_2^- , las actividades antioxidantes Superóxido dismutasa (SOD) y Peroxidasa (POX), así como el contenido total de fenoles, flavonoides y fenilpropanoides glicósidos, la actividad Polifenoloxidasas (PPO) estrechamente relacionada con estos metabolitos secundarios, y la capacidad antioxidante total (FRAP).

La variedad, el sistema de cultivo y el estado de maduración, junto con la influencia variable del año de cosecha, influyen en las actividades enzimáticas oxidantes y antioxidantes, así como en los compuestos antioxidantes como los fenoles. Una comprensión completa del efecto y la interrelación de estos factores requiere un diseño experimental exhaustivo, un enfoque científico multidisciplinario y un método estadístico apropiado para el análisis de los datos.

Los resultados obtenidos y procesados se muestran en la tabla 6. Como puede observarse, la visualización de estos resultados y, sobre todo, el análisis estadístico comparativo es difícil de realizar, pero sobre todo de interpretar de una forma sencilla y clara. Esto es debido a la multiplicidad de factores y variables que intervienen.

Para tratar de clarificar los resultados se ha realizado una primera aproximación consistente en la comparación de estos datos respecto de cada una de las variables. Así, se ha aplicado una t-Student para la comparación de todos los parámetros medidos en las tres campañas respecto de la variedad y respecto de las condiciones de cultivo, mientras que para la influencia del estado de maduración se han analizado mediante una ANOVA con test post-hoc de Duncan. Los resultados de este análisis

general se muestran en la tabla 7, que ha permitido simplificar la tabla 6, haciéndola más fácilmente comprensible y permitiendo para cada uno de los parámetros que, una vez que sean representados gráficamente, se puedan comparar los diferentes valores obtenidos con las diferentes condiciones (variedad, cultivo, estado maduración, año), y cuyas diferencias significativas aparecen en esta tabla.

Este tratamiento primario de los datos ha permitido un estudio detallado de la respuesta de cada uno de los parámetros con respecto a todas las variables estudiadas a lo largo de las tres campañas. Los resultados obtenidos son los que se muestran en los siguientes apartados de este capítulo y presentan la ventaja de visualizar el diferente comportamiento en cada uno de los años, visión que se pierde en los estudios en los que se realizan trabajos similares a este aquí presentado y en los que, para poder obtener tablas y figuras más sencillas y fáciles de explicar, se realizan las medias de los valores obtenidos en las diferentes campañas estudiadas (Montaño, 2016, Gamero et al., 2014). La realización de las medias entre diferentes campañas podría enmascarar algunos resultados muy interesantes que pueden depender de factores variables, y que se verían anulados. No obstante, también se ha realizado este estudio en cada uno de los apartados.

El objetivo del presente estudio fue obtener una visión general del efecto año, el estado de maduración, el sistema de cultivo y la influencia de la variedad sobre varios parámetros bioquímicos relacionados con el estrés oxidativo de la aceituna. Para este fin, se aplica la técnica de escalamiento multidimensional asociada con un análisis triádico parcial (MDS-PTA). Este novedoso enfoque tiene la ventaja de que permite reemplazar el análisis de coeficientes vectoriales (matriz de coeficientes de correlación vectorial) por una exploración visual del espacio común, y así identificar qué factor produce la mayor homogeneidad. Para ello, en primer lugar se realiza esta nueva tabla 7, con datos más simplificados y que permiten una primera aproximación estadística al comportamiento de las variables muestreadas a lo largo de todas las campañas, y después se aplica un análisis MDS-PTA que permite visualizar mejor el factor o factores que más inciden sobre los resultados que se han obtenido.

Tabla 6. Parámetros bioquímicos correspondientes a las aceitunas de las variedades Morisca y Manzanilla en las condiciones experimentales utilizadas y durante los 3 años de estudio.

Año	var	irrigación	EM	PS/PF	Aminoácidos solubles	Proteínas totales	Oxidación NADH	Producción O ₂ ⁻	SOD	POX	Fenoles totales	Flavonoides totales	PPGs totales	PPO	FRAP
2011	Mor	sin riego	E1	0.264±0.022	3321.6±301.5	0.963±0.100	354.9±84.6	309.9±59.9	42.5±9.9	60.2±4.9	1671.2±55.4	4356.5±324.6	7269.5±513.0	080.1±136.8	21.7±0.8
			E2	0.286±0.030	3503.5±331.0	1.271±0.040	596.4±160.5	142.7±59.7	50.8±9.0	161.8±35.5	1719.1±261.0	4284.2±497.0	6942.7±191.9	298.8±33.7	26.7±0.6
			E3	0.347±0.050	6055.7±65.4	3.380±0.400	422.0±137.0	207.6±61.0	43.9±7.3	60.8±13.0	2213.6±39.3	6874.6±181.1	9305.7±1787.9	379.9±70.1	27.9±0.4
		con riego	E1	0.300±0.020	2761.2±430.7	1.009±0.090	248.9±25.2	148.0±33.5	44.9±9.5	32.6±4.7	1746.0±51.6	5171.0±146.6	7761.5±550.8	026.5±193.9	21.5±0.9
			E2	0.265±0.030	2319.7±409.0	1.150±0.200	452.5±22.4	158.9±25.2	49.3±7.9	101.8±9.6	1726.1±12.3	4642.4±529.3	6215.9±498.7	718.4±75.2	26.5±0.6
			E3	0.318±0.020	5423.7±204.0	3.750±0.500	506.7±51.0	280.1±81.8	58.4±17.9	98.0±21.0	2221.6±14.1	7023.2±65.8	9894.0±860.7	336.3±29.8	28.0±0.3
	Man	sin riego	E1	0.351±0.033	2087.0±324.0	0.652±0.130	904.8±130.8	393.2±50.3	140.7±18.5	187.4±17.1	1680.7±73.2	4448.4±331.5	7162.5±423.5	166.7±105.5	22.0±1.0
			E2	0.289±0.010	1015.8±149.0	1.067±0.160	688.7±43.5	355.7±23.7	58.5±10.4	124.7±9.6	2002.5±75.6	5230.3±812.5	7883.4±724.2	349.7±34.1	26.6±0.6
			E3	0.362±0.030	3962.7±73.8	3.360±0.300	252.7±19.0	61.2±17.0	66.3±14.5	51.6±5.2	2217.9±33.7	6997.7±174.5	10285.0±944.7	260.2±66.7	27.9±0.3
		con riego	E1	0.324±0.030	2513.2±324.7	0.565±0.060	875.9±153.1	392.8±52.5	135.8±14.3	162.5±12.2	1791.6±44.6	5347.1±115.4	8186.3±322.1	650.8±49.1	22.0±0.8
			E2	0.289±0.020	1115.5±185.3	1.191±0.170	745.3±135.5	202.7±17.5	49.4±11.3	99.9±24.2	1958.2±168.3	5152.3±817.0	6291.6±816.9	462.7±76.9	26.8±0.7
			E3	0.364±0.061	4332.5±187.0	3.070±0.500	541.6±77.9	225.8±87.0	64.9±15.8	79.3±10.0	2226.2±23.7	6966.5±141.7	10275.2±671.9	506.4±72.3	27.8±0.1
	Mor	sin riego	E1	0.380±0.006	2441.6±272.0	1.860±0.170	444.1±46.9	258.6±66.8	67.5±6.9	1096.9±20.8	3984.4±574.6	10430.4±1048.0	16208.4±1217.2	479.5±37.2	100±37.9
			E2	0.318±0.020	2453.8±271.0	2.189±0.300	2079.7±127.0	1053.7±248.0	120.2±10.0	261.0±19.1	2987.5±422.0	6904.1±657.6	11998.3±1274.0	124.6±110.0	98.2±6.9
			E3	0.337±0.020	5239.6±907.9	2.545±0.100	902.6±243.0	433.3±70.0	104.2±10.7	161.9±28.8	4240.2±758.9	9237.1±1549.2	13571.0±1867.7	368.0±45.9	124.4±7.4
		con riego	E1	0.295±0.010	1592.0±277.2	1.557±0.180	478.4±64.7	497.7±48.4	60.6±0.5	153.4±18.6	3384.1±456.9	7839.6±976.4	14300.1±1051.8	351.8±57.6	97.0±5.7
			E2	0.259±0.030	4249.3±514.0	2.292±0.100	1144.0±388.0	638.9±169.0	90.5±17.0	255.1±30.4	2049.3±171.0	4875.0±479.0	7095.4±438.4	289.7±11.2	98.7±11.3
			E3	0.300±0.008	5523.0±855.2	2.505±0.100	754.6±239.0	531.3±131.2	92.8±12.4	100.7±16.6	3759.8±1153.1	8462.3±1600.0	10050.2±1765.9	304.8±32.5	110.8±18.3

2012	Man	sin riego	E1	0.324±0.015	1428.7±399.6	0.898±0.160	787.5±73.4	492.6±70.2	162.1±14.1	205.7±31.4	3263.9±364.8	7960.9±996.7	13187.8±1421.3	352.9±63.3	127.5±11.5
			E2	0.341±0.008	1598.5±53.6	0.982±0.070	1034.7±205.0	427.2±101.0	226.0±5.7	143.3±28.0	1999.6±307.0	5568.6±338.9	10955.1±1362.5	296.6±57.5	118.6±9.6
			E3	0.292±0.014	2538.7±728.3	1.960±0.170	916.7±206.8	381.8±51.3	141.6±15.7	99.9±19.2	4077.1±327.6	8799.3±860.6	13867.0±1381.2	350.9±39.0	125.4±12.1
		con riego	E1	0.303±0.010	2484.3±239.5	0.759±0.210	390.7±67.5	319.6±52.3	171.7±29.6	167.3±38.7	2920.6±683.5	5776.8±517.5	10998.5±1122.3	341.3±31.9	103.0±10.6
			E2	0.262±0.020	3185.0±298.0	1.292±0.100	955.1±60.0	327.3±79.0	187.1±37.0	160.7±15.0	2257.7±193.0	5178.1±320.9	10468.1±971.9	276.4±32.5	97.7±5.7
			E3	0.278±0.015	2541.7±234.2	2.160±0.380	856.8±102.8	341.1±49.6	155.9±20.9	73.6±23.8	4323.5±362.1	7895.0±673.1	10892.1±1663.6	475.5±49.1	135.9±16.3
2013	Mor	sin riego	E1	0.290±0.022	1843.6±258.1	1.449±0.210	386.1±121.8	251.9±29.7	41.9±7.9	77.1±9.1	3825.9±249.8	8901.0±438.4	15009.9±860.3	455.3±49.9	109.0±21.1
			E2	0.312±0.020	2296.7±307.5	2.058±0.280	1146.8±183.8	333.6±72.1	128.3±14.6	146.9±36.0	3369.4±546.4	8444.3±755.2	12134.0±602.1	280.2±23.6	92.6±15.8
			E3	0.316±0.019	2102.0±150.1	1.947±0.210	186.9±29.3	104.1±34.8	129.6±14.9	21.1±1.9	3398.9±142.2	7067.3±760.0	11705.5±1567.7	354.6±56.8	106.1±14.0
		con riego	E1	0.270±0.017	1604.6±180.6	1.366±0.150	324.5±25.7	252.1±50.2	50.7±7.8	56.2±8.1	3673.2±418.6	5539.1±231.8	13527.9±1271.7	424.1±35.2	98.9±11.1
			E2	0.296±0.020	2125.5±330.9	2.198±0.210	677.9±107.4	273.3±25.1	105.2±10.0	165.5±5.7	2854.5±412.0	5629.5±983.5	13134.6±424.2	250.6±56.3	69.1±8.8
			E3	0.274±0.017	3153.5±298.9	2.013±0.260	1206.0±191.0	432.0±66.1	109.6±18.7	158.4±15.8	3230.6±97.7	6182.8±301.8	9332.2±956.5	306.8±45.3	85.1±5.9
	Man	sin riego	E1	0.309±0.028	1228.7±146.3	0.628±0.090	308.1±37.5	294.3±58.1	114.0±17.5	52.4±11.2	2937.2±389.1	5477.6±251.2	10760.8±961.7	249.0±54.3	91.6±11.3
			E2	0.299±0.030	1778.5±281.6	1.487±0.080	1272.4±225.0	358.8±74.9	208.1±15.0	180.6±32.2	2817.6±140.0	6252.6±781.0	12566.9±1014.4	215.2±18.7	115.9±17.5
			E3	0.317±0.029	1977.7±277.3	1.848±0.250	624.5±50.2	240.3±45.9	213.0±33.9	71.6±10.9	3598.9±108.7	6849.0±291.3	11899.8±172.7	313.8±61.9	120.5±20.3
		con riego	E1	0.252±0.006	1139.1±216.4	0.576±0.140	345.5±74.0	238.9±32.0	110.7±18.0	46.2±12.3	3347.7±638.9	6447.8±569.1	12304.3±1111.2	258.0±38.6	108.7±8.3
			E2	0.228±0.020	975.9±186.6	1.266±0.240	749.1±182.0	272.4±50.4	142.3±12.8	177.9±21.3	2687.5±98.0	4739.0±359.0	9189.6±946.9	182.7±48.8	66.7±14.2
			E3	0.285±0.015	216.4±273.5	2.077±0.160	717.6±115.0	219.6±65.0	195.9±11.3	65.7±13.6	3296.3±67.9	6218.9±265.7	8791.5±565.6	323.9±56.8	95.7±17.3

1 Aminoácidos y proteínas totales en mg g⁻¹ PF; oxidación NADH, producción O₂⁻ y actividad POD en nmoles min⁻¹ mg⁻¹ proteína; actividad SOD y PPO en U mg⁻¹ proteína; fenoles,
2 flavonoides, PPGs totales y actividad FRAP en µg g⁻¹ PF.
3
4
5

6 **Tabla 7.** Valores medios obtenidos a partir de la Tabla 6. Se aplica una t-Student test para la comparación entre variedades y condiciones de cultivo, mientras que para
7 comparar los valores respecto del estado de maduración se aplica una ANOVA con un test post-hoc de Duncan.

Campaña	Parámetro	Estado de maduración			Variedad		Condiciones de cultivo	
Año		E1	E2	E3	MOR	MAN	SECANO (S)	REGADIO (R)
2011	PS/PF	0.31±0.04 ^a	0.29±0.01 ^a	0.36±0.01 ^b	0.31±0.04	0.33±0.03	0.32±0.04	0.32±0.04
	Aminoácidos totales	2881.39±1302.18 ^a	2143.42±1373.52 ^a	5997.94±1205.93 ^b	4407.07±1990.09	2941.44±2114.21	4057.55±2235.33	3290.95±2090.42
	Proteínas totales	0.8±0.22 ^a	1.39±0.51 ^b	3.39±0.28 ^c	2.07±1.24	1.65±1.24	1.93±1.23	1.79±1.29
	Fenoles totales	1728.66±21.34 ^a	1914.04±109.03 ^b	2219.83±5.34 ^c	1933.56±243.16	1974.79±213.8	1976.51±218.02	1931.84±239.01
	Flavonoides totales	4329.78±350.09 ^a	5136.93±726.72 ^b	6965.51±64.86 ^c	5202.72±1414.3	5752.09±1062.8	5360.79±1369.48	5594.03±1184.39
	PPGs totales	7201.57±428.02 ^a	7574.32±1130.14 ^a	9535.05±291.91 ^b	8000.37±1559.27	8206.93±992.34	8275.19±1049.53	7932.1±1506.49
	Oxidación NADH	700.52±351.12	586.98±95.40	410.33±110.63	459.73±92.89	672.15±292.05	564.57±262.15	567.31±228.62
	Producción O ₂ ⁻	261.77±100.97	226.22±96.93	193.69±93.53	201.06±63.09	253.39±115.04	243.36±112.58	211.1±74.55
	SOD	104.09±56.86	57.77±8.38	76.04±27.98	55.51±10.01 ^a	103.09±43.18 ^b	75.37±33.99	83.23±46.15
	POX	129.49±68.02	116.53±32.91	72.44±20.56	82.93±23.46	129.38±57.14	106.23±58.77	106.07±40.70
	PPO	620.78±97.54 ^b	549.55±147.42 ^{ab}	395±60.50 ^a	575.88±159.94	467.67±98.26	505.37±161.44	538.19±124.7
	FRAP	21.53±0.27 ^a	26.65±0.27 ^b	27.91±0.11 ^c	25.36±3.14	25.38±2.91	25.36±3.14	25.37±2.91
	PS/PF	0.33±0.04	0.30±0.04	0.30±0.03	0.32±0.04	0.30±0.03	0.33±0.03 ^b	0.28±0.02 ^a
	Aminoácidos totales	2129.13±372.13	2871.67±1124.23	4068.86±1845.63	3709.01±1723.58	2337.43±564.23	2700.51±1412.64	3345.92±1473.89

2012	Proteínas totales	1.27±0.53 ^a	1.69±0.65 ^{ab}	2.3±0.28 ^b	2.16±0.39 ^b	1.34±0.59 ^a	1.74±0.66	1.76±0.67
	Fenoles totales	3364.66±341.11 ^b	2378.22±459.13 ^a	4275.16±175.37 ^c	3456.69±852.88	3222.01±945.74	3431.36±875.33	3247.34±931.85
	Flavonoides totales	8036.74±1173.19 ^b	5822.83±825.84 ^a	8864.37±657.16 ^b	7830.58±1825.51	7318.72±1400.4	8226.61±1511.64	6922.69±1464.79
	PPGs totales	13707.22±1702.28 ^b	10188.89±1712.84 ^a	12530.53±1539.8 ^{ab}	12380.74±2671.44	11903.68±1667.58	13379.02±1785.77 ^b	10905.4±1787.10 ^a
	Oxidación NADH	525.17±178.54	1303.38±523.29	986.75±238.28	967.24±605.10	909.63±307.24	1036.87±551.93	840±366.95
	Producción O ₂ ^{·-}	296.75±65.86 ^a	646.79±289.96 ^b	458.61±63.37 ^{ab}	535.55±292.27	399.22±89.37	501.64±286.98	433.14±139.25
	SOD	82.14±46.23	155.97±61.76	126.72±33.36	82.12±32.45 ^a	161.1±40.69 ^b	126.27±59.56	116.95±53.39
	POX	104.32±41.49 ^a	206.01±60.77 ^b	114.99±27.87 ^a	146.33±88.73	137.21±28.09	140.02±68.81	143.52±63.01
	PPO	364.39±90.72	309.75±82.51	401.67±79.85	383.53±67.15	333.67±101.33	382.1±64.82	335.1±103.64
	FRAP	114.93±5.67	107.63±18.88	127.95±9.66	111.07±11.42	122.61±15.77	122.19±15.59	111.49±12.13
<hr/>								
2013	PS/PF	0.28±0.03	0.29±0.04	0.3±0.02	0.29±0.02	0.28±0.04	0.31±0.01 ^b	0.27±0.03 ^a
	Aminoácidos totales	1534.27±360	1850.05±747.9	2320.39±409.15	2252.1±436.51 ^b	1551.04±527.98 ^a	1903.97±428.98	1899.17±761.68
	Proteínas totales	1.01±0.47 ^a	1.76±0.45 ^b	1.97±0.10 ^b	1.84±0.34	1.32±0.62	1.57±0.52	1.59±0.63
	Fenoles totales	3450.59±404.68	2932.24±300.09	3441.97±245.84	3398.78±389.4	3151.08±375.58	3411.8±437.74	3138.06±304.84
	Flavonoides totales	7236.66±1511.28	6067.16±1191.29	7025.39±721.62	7291.89±1189.2	6260.91±1050.64	7297.63±1284.54	6255.17±923.97
	PPGs totales	12860.89±2128.31	11296.54±1863.61	11465.14±1985.75	12599.61±1998.58	11148.77±1757.82	12888.83±1832.84	10859.54±1586.54
	Oxidación NADH	361.13±52.54 ^a	1018.83±314.71 ^b	683.53±418.01 ^{ab}	706.32±465	669.34±349.18	689.15±488.34	686.51±317.01

Producción O_2^-	245.05±42.66	325.61±44.68	265.62±114.75	295.25±95.55	262.26±56.67	278.54±78.72	278.98±82.44
SOD	84.05±39.23 ^a	149.73±43.12 ^{ab}	179.91±41.36 ^b	104.85±45.92	170.94±46.68	142.49±65.43	133.29±50.77
POX	57.25±14.06 ^a	147.01±29.95 ^b	71.42±50.02 ^a	85.39±51.98	98.39±55.51	85.6±60.06	98.19±46.71
PPO	365.76±116.23 ^{ab}	232.17±42.32 ^a	391.27±32.48 ^b	364.67±89.56	294.79±102.69	334.75±106.69	324.71±100.27
FRAP	98.47±13.10	83.69±23.55	107.01±20.23	91.93±18.5	100.84±22.67	107.25±17.71 ^b	85.52±17.51 ^a

8 Para cada parámetro, los valores con diferentes letras muestran diferencias significativas ($p < 0.05$).

9 Aminoácidos y proteínas totales expresadas como $mg\ g^{-1}$ PF; oxidación de NADH, producción de O_2^- y actividad POX expresadas como $nmoles\ min^{-1}\ mg^{-1}$ proteína;
10 actividad SOD y PPO expresadas como $U\ mg^{-1}$ proteína; fenoles, flavonoides y PPGs totales, y FRAP expresados como $\mu g\ g^{-1}$ PF

2.- Relación peso seco/peso fresco, aminoácidos solubles y proteínas totales

La **relación peso seco/peso fresco (PS/PF)** de las aceitunas procedentes de las variedades Morisca y Manzanilla, cultivadas tanto en secano como en regadío, en diferentes estados de maduración y en los tres años estudiados, se muestra en la figura 21.

En primer lugar, los valores PS/PF son, en general, semejantes a lo largo de los tres años estudiados, con independencia tanto del estado de maduración como de la variedad y de la condición de cultivo, secano o riego. De este modo, se puede ver cómo en el año 2011 (figura 21A), en la variedad Morisca y en condiciones de secano, esta relación va aumentando con el estado de maduración, aunque únicamente existen diferencias estadísticamente significativas entre E1 y E3 (0,264 vs 0,347). En regadío, no existen diferencias entre los valores medios registrados, oscilando éstos entre 0,265 a 0,318. En cuanto al comportamiento de este parámetro en la variedad Manzanilla, se observa una disminución de la relación PS/PF en E2, que se produce tanto en secano como en regadío, mostrando E1 y E3 valores similares.

En 2012 (figura 21B), de nuevo se observa cómo hay poca variabilidad en los registros obtenidos, con escasas diferencias entre los valores. Así, en la variedad Morisca en condiciones de secano, únicamente en el estado E1, la relación PS/PF es significativamente superior a la observada en los estados E2 y E3 (0,38 vs 0,318 y 0,337). En condiciones de regadío, los valores son ligeramente inferiores a los de secano, y únicamente existen diferencias estadísticamente significativas entre los valores de los estados E2 y E3 (0,259 vs 0,300). Respecto a la variedad Manzanilla, en secano se observa que esta relación disminuye en el estado de mayor maduración (0,292 en E3 frente a 0,324 y 0,341 en E1 y E2, respectivamente); en condiciones de regadío, también se aprecia un descenso de esta relación con el estado de maduración, si bien en este caso esta bajada es más temprana, produciéndose en E2 (0,303; 0,262 y 0,278 en E1, E2 y E3, respectivamente).

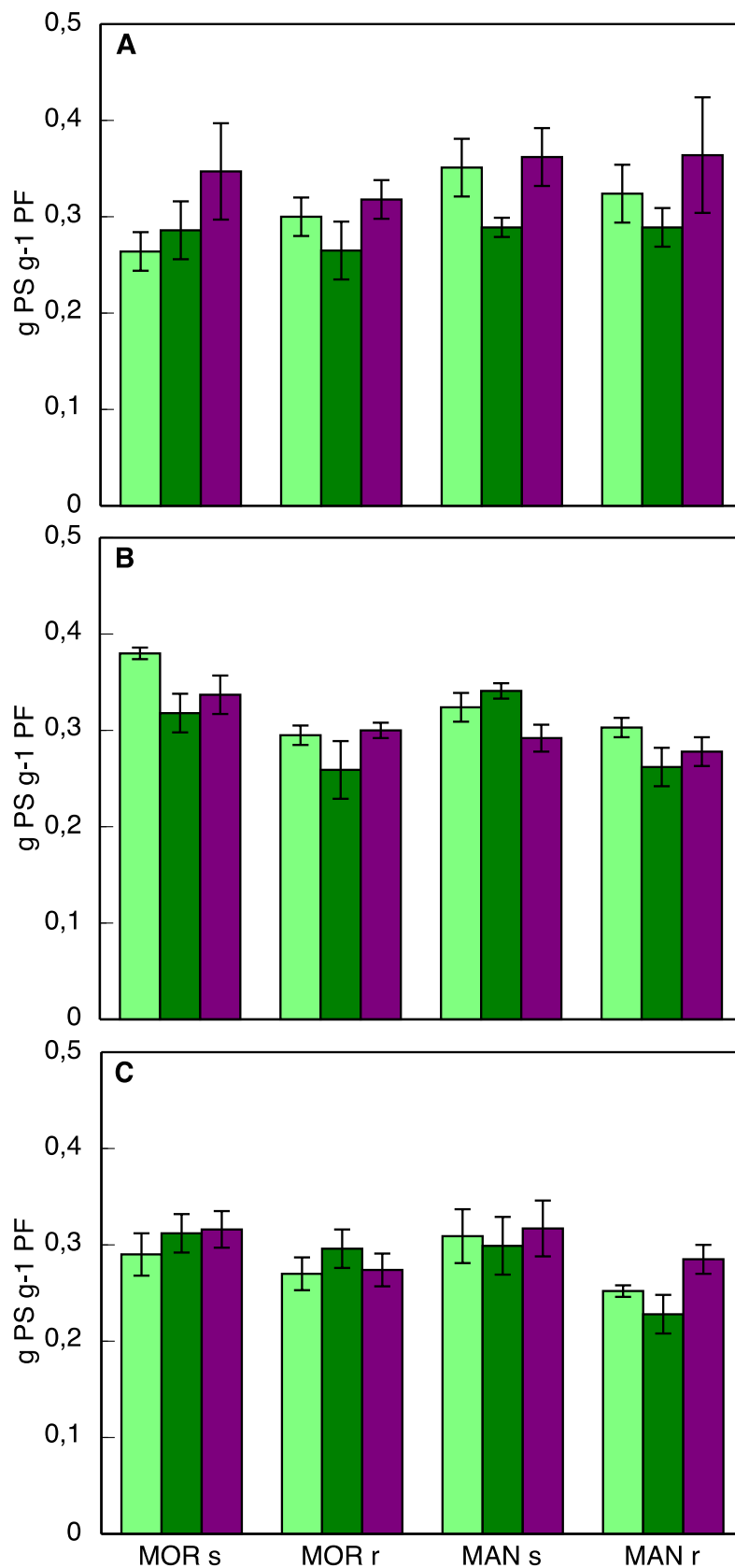


Figura 21. Relación entre el peso seco/peso fresco de aceitunas de las variedades Morisca y Manzanilla de Sevilla en los tres estados de maduración estudiados (E1-■-, E2 -■- y E3 -■-), en seco (s) y regadío (r) durante los años 2011 (A), 2012 (B) y 2013 (C). Los datos son medias±SD de, al menos, 5 repeticiones independientes, realizadas por triplicado.

Respecto al año 2013 (figura 21C), de nuevo se observa homogeneidad en los valores de la relación PS/PF medidos. En cuanto a la variedad Morisca, en condiciones de secano no existen diferencias entre los valores medios registrados en base al estado de maduración, con valores que oscilan entre 0,290 y 0,316. La variedad Morisca en condiciones de regadío, de nuevo se aprecia que no hay diferencias entre los distintos estados de maduración, obteniéndose valores medios entre 0,270 y 0,296. En lo referente a la variedad Manzanilla, en condiciones de secano estos valores son prácticamente iguales, con diferencias mínimas que fluctúan entre 0,299 y 0,317. En condiciones de regadío, donde la esta relación es ligeramente inferior, existen diferencias estadísticamente significativas entre el estado E3 y los otros dos estados (0,285 vs 0,252 y 0,228).

Estudiando en conjunto los valores de los 3 años estudiados en este trabajo (figura 22) se observa que, prácticamente, la relación PS/PF no varía ni con el estado de maduración ni con la variedad. Tampoco se observa una influencia significativamente diferente por las condiciones de secano o de regadío, si bien sí hay una cierta tendencia a la disminución en esta relación en las condiciones de regadío, indicativo de un incremento en el contenido hídrico de estas aceitunas como consecuencia del mayor suministro de agua.

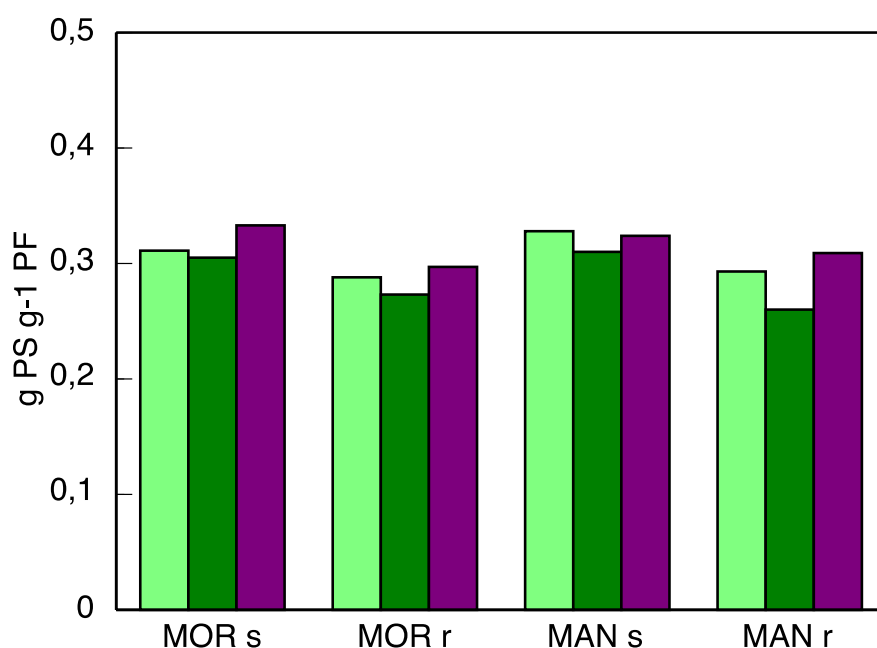


Figura 22. Relación entre el peso seco/peso fresco de aceitunas de las variedades Morisca y Manzanilla de Sevilla en los tres estados de maduración estudiados (E1-■-, E2 -■- y E3 -■-), en secano (s) y regadío (r). Los datos son medias de los tres años medidos.

En la figura 23 se representa el **contenido en aminoácidos solubles totales** en ambas variedades y en los diferentes años medidos, tanto en secano como regadío. El contenido en aminoácidos en las dos variedades muestra grandes diferencias en función del año estudiado, así como según el grado de maduración de la aceituna. De este modo, en el año 2011 (figura 23A), la variedad Morisca presenta en condiciones de secano unos valores muy similares en los estados E1 y E2, sin diferencias significativas entre ellos (3.321,63 y 3.503,50 $\mu\text{g g}^{-1}$ PF en E1 y E2, respectivamente) sin embargo en el estado E3 hay un aumento considerable del contenido en aminoácidos (6.055,75 $\mu\text{g g}^{-1}$ PF), en condiciones de regadío, el resultado es semejante, aunque con valores ligeramente menores: 2.761,20; 2.319,75 y 5.423,75 $\mu\text{g g}^{-1}$ PF para E1, E2 y E3, respectivamente. En cuanto a la variedad Manzanilla, no hay variación entre las condiciones de secano y de regadío, si entre los diferentes estados de maduración: En E2 se aprecia una significativa bajada del contenido de aminoácidos con respecto a E1 y en E3, igual que ocurría en Morisca, hay un aumento de este contenido, con valores muy por encima que los mostrados en E1.

En el año 2012 se registró un contenido en aminoácidos diferente a las descritas anteriormente (figura 23B). La variedad Morisca en condiciones de secano registró valores prácticamente idénticos en los estados de maduración E1 y E2, 2.441,63 y 2.453,83 $\mu\text{g g}^{-1}$ PF respectivamente; sin embargo, en el estado E3, este valor fue significativamente más elevado, 5.239,63 $\mu\text{g g}^{-1}$ PF. La variedad Morisca en condiciones de regadío presenta diferencias significativas entre los tres estados de maduración. De este modo, el contenido en aminoácidos es creciente frente al estado de maduración de la aceituna, alcanzando valores medios de 1.592,00, 4.249,33 y 5.523,01 $\mu\text{g g}^{-1}$ PF, para los estados E1, E2 y E3, respectivamente. En cuanto a la variedad Manzanilla, en condiciones de secano no hay diferencias significativas entre el contenido en aminoácidos en los estados E1 y E2, aumentando en el estado E3 (1.428,67; 1.598,50 y 2.538,75 $\mu\text{g g}^{-1}$ PF, para E1, E2 y E3, respectivamente). Sin embargo, en condiciones de regadío se obtienen valores semejantes en E1 y E3, siendo el estado E2 donde se alcanzan los valores mayores (2.484,33; 3.185,00 y 2.541,67 $\mu\text{g g}^{-1}$ PF, para E1, E2 y E3, respectivamente).

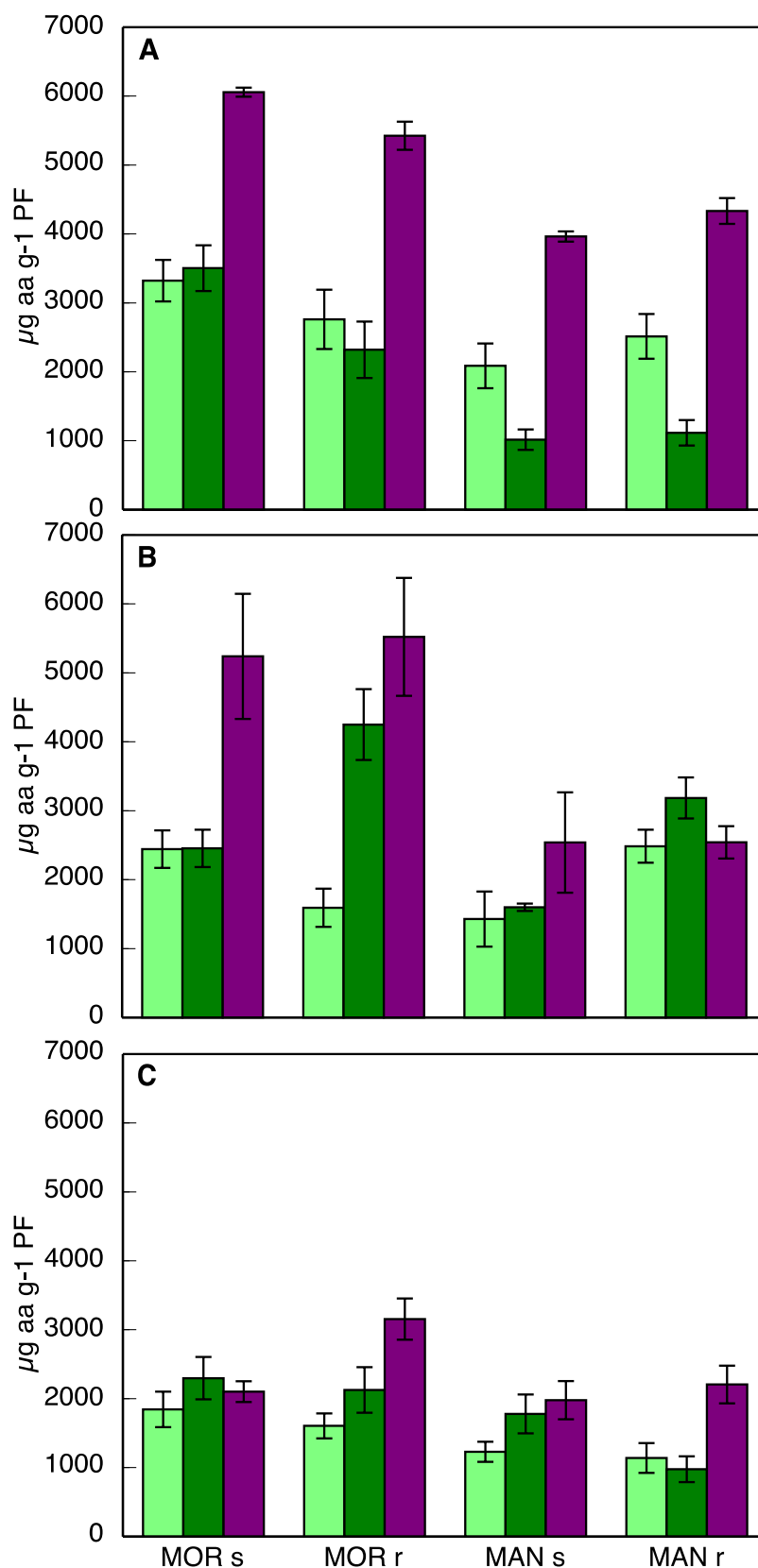


Figura 23. Contenido de aminoácidos solubles en aceitunas de las variedades Morisca y Manzanilla de Sevilla en los tres estados de maduración estudiados (E1-■-, E2 -■- y E3 -■-), en seco (s) y regadío (r), durante los años 2011 (A), 2012 (B) y 2013 (C). Los datos son medias±SD de, al menos, 5 repeticiones independientes, realizadas por triplicado.

Por último, en el año 2013 (figura 23C), se registran los menores valores de toda la serie, no superándose en ninguno de los estados ni condiciones más de $3.200 \mu\text{g g}^{-1}$ PF. La variedad Morisca en condiciones de secano presenta valores semejantes en los diferentes estados de maduración, oscilando entre $1.843,63$ y $2.296,67 \mu\text{g g}^{-1}$ PF. En condiciones de regadío, el contenido en aminoácidos aumenta de forma gradual en función al grado de maduración, existiendo diferencias estadísticamente significativas entre el estado E1 y el E3, oscilando este contenido $1.604,60$ y $3.153,50 \mu\text{g g}^{-1}$ PF. El comportamiento de la variedad Manzanilla en condiciones de secano fue muy parecido a este último, aunque con valores ligeramente inferiores, $1.228,67$; $1.778,50$ y $1.977,75 \mu\text{g g}^{-1}$ PF para E1, E2 y E3, respectivamente. Por último, en regadío, la variedad Manzanilla mostró valores muy semejantes en E1 y E2, y mucho mayor en E3, siendo E2 la más baja, con $975,88 \mu\text{g g}^{-1}$ PF, y E3 la más alta, con $2.205,75 \mu\text{g g}^{-1}$ PF.

Para ver el comportamiento general, sin tener en cuenta las desviaciones, se realizan las medias con los datos de los tres años (figura 24), observándose, en general, que el contenido en aminoácidos parece aumentar con el estado de maduración, especialmente en las aceitunas más maduras, mientras que el factor secano/regadío no parece tener una influencia clara en este parámetro. Y entre variedades, la Morisca presenta valores más altos en estos compuestos que Manzanilla.

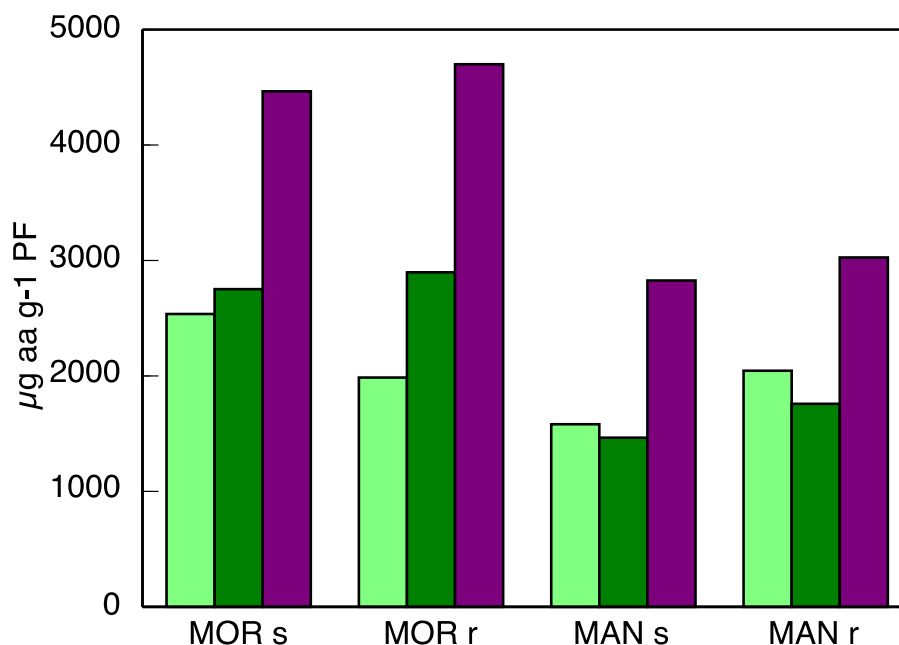


Figura 24. Contenido de aminoácidos solubles en aceitunas de las variedades Morisca y Manzanilla de Sevilla en los tres estados de maduración estudiados (E1-■-, E2 -■- y E3 -■-), en secano (s) y regadío (r). Los datos son medias de los tres años medidos.

Cuando se analiza el **contenido en proteínas totales**, figura 25, de las dos variedades estudiadas y en las condiciones experimentales previamente descritas, se observa que en 2012 y 2013, pese a una peculiaridad que se comentará a continuación, se comportaron de una forma semejante, mientras que 2011 tuvo unos registros muy diferentes. Estudiando los resultados obtenidos en 2011 (figura 25A), se observa que en la variedad Morisca, en condiciones de secano, conforme aumenta el estado de maduración, aumenta el contenido proteico, sobre todo en el estado E3 (0,963; 1,27 y 3,38 mg g⁻¹ PF, en los estados E1, E2 y E3, respectivamente con una diferencia estadísticamente significativa). En condiciones de regadío, los valores fueron semejantes, aunque la diferencia entre E1 y E2 no fue significativa (1,009 y 1,15 mg g⁻¹ PF), y la concentración registrada en E3 fue la más alta de la serie, con un valor medio de 3,75 mg g⁻¹ PF. En cuanto a la variedad Manzanilla, el comportamiento fue prácticamente idéntico en condiciones de secano y regadío, con valores medios crecientes en función del estado de maduración, y existiendo diferencias estadísticamente significativas entre los diferentes valores. Así, los valores en secano oscilan entre 0,652 y 3,36 mg g⁻¹ PF, siendo muy semejantes en condiciones de regadío, donde los valores van de 0,565 a 3,07 mg g⁻¹ PF, siempre correspondiendo el inferior al estado E1 y el superior al estado E3.

En el año 2012 (figura 25B), el contenido en proteínas para la variedad Morisca en condiciones de secano aumentaba ligeramente con la maduración, existiendo diferencias estadísticamente significativas entre E1 y E3 (1,86 vs 2,545 mg g⁻¹ PF). En condiciones de regadío, esta variedad tiene un comportamiento parecido, aunque el contenido proteico en el estado E1 fue significativamente inferior a la de los otros dos estados, no habiendo diferencias estadísticamente significativas entre ellos. Los valores oscilan entre 1,557 y 2,505 mg g⁻¹ PF. En cuanto a la variedad Manzanilla, existen diferencias entre las condiciones de secano y regadío, pese a seguir un patrón parecido. Esto se debe a que, mientras que en secano la cantidad de proteínas en los estados E1 y E2 es semejante, en el estado E3 es significativamente superior (0,898 y 0,982 vs 1,96 mg g⁻¹ PF, respectivamente), en condiciones de regadío el aumento en base al estado de maduración es más progresivo, existiendo diferencias

estadísticamente significativas entre los tres estados. Así, se registraron unos valores de 0,759, 1,292 y 2,16 mg g⁻¹ PF para E1, E2 y E3, respectivamente.

Cuando se analiza el año 2013 (figura 25C), se observa que la variedad Morisca registró un contenido en proteínas muy parecido entre las condiciones de secano y regadío, con la peculiaridad de que, al contrario que ocurría en el año 2012, en el estado E3 disminuye. En condiciones de secano, las proteínas en el estado E1 fueron significativamente menores que en E2 y E3, que presentaron valores muy semejantes (1,449 vs 2,058 y 1,947 mg g⁻¹ PF). En condiciones de regadío se repitieron estos registros, menores valores en E3 frente a E2 (2,198 vs 2,013 mg g⁻¹ PF). En el estado E1 se obtuvo de nuevo un valor significativamente inferior (1,366 mg g⁻¹ PF). En cuanto a la variedad Manzanilla, el resultado fue semejante al del año 2012, aunque con valores ligeramente inferiores. El contenido en proteínas en secano aumentaba en función al estado de maduración, con valores de 0,628; 1,487 y 1,848 mg g⁻¹ PF, para E1, E2 y E3, respectivamente, siendo las diferencias entre valores estadísticamente significativas. Bajo condiciones de regadío, los valores siguieron el mismo patrón (0,576, 1,266 y 2,077 mg g⁻¹ PF, para los estados E1, E2 y E3, respectivamente).

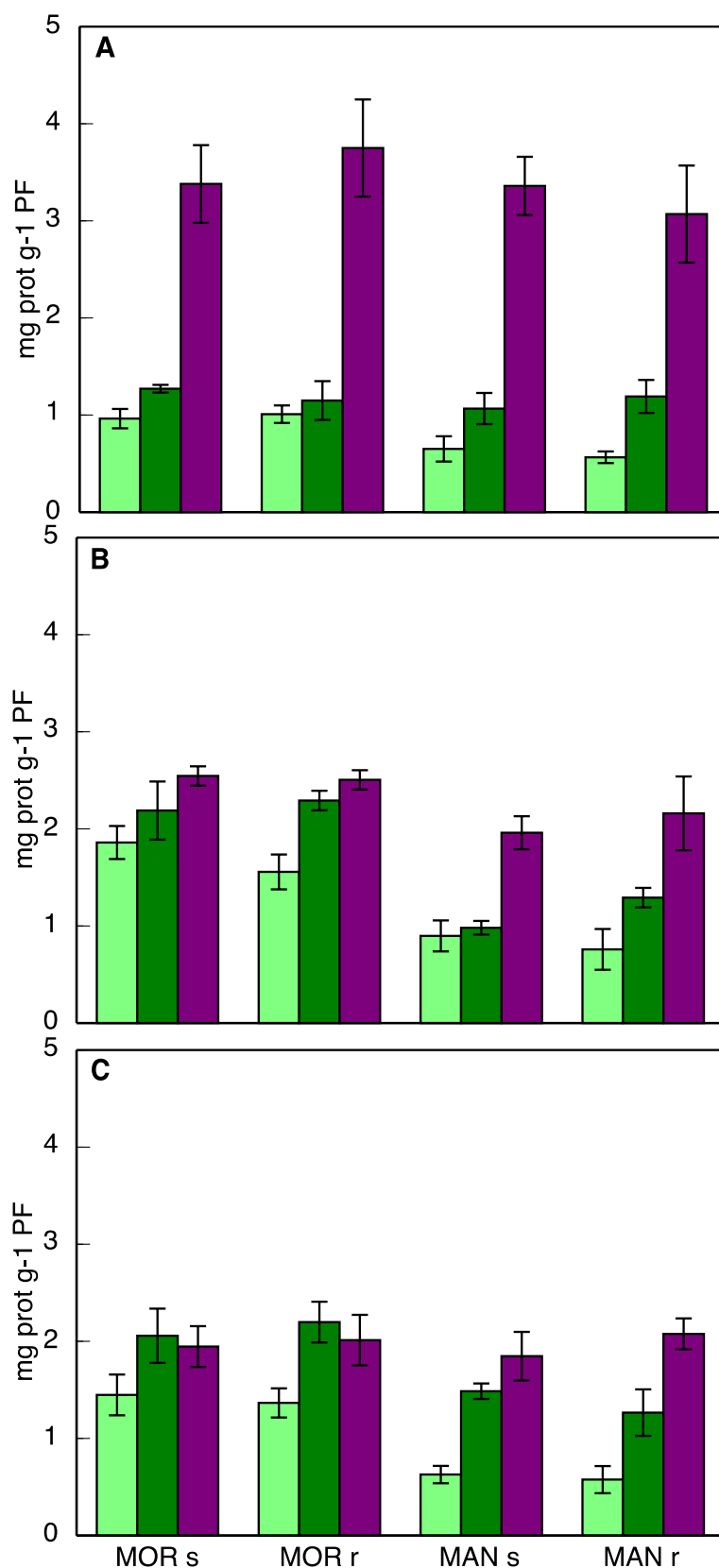


Figura 25. Contenido de proteínas en aceitunas de las variedades Morisca y Manzanilla de Sevilla en los tres estados de maduración estudiados (E1-■-, E2 -■- y E3 -■-), en seco (s) y regadío (r), durante los años 2011 (A), 2012 (B) y 2013 (C). Los datos son medias±SD de, al menos, 5 repeticiones independientes, realizadas por triplicado.

Al realizar las medias de los tres años de forma conjunta (figura 26), se puede observar que el contenido de proteínas aumenta con el estado de maduración de la aceituna en ambas variedades, tanto en condiciones de secano como de regadío. Es importante resaltar que no se observa influencia alguna de los niveles de aporte hídrico en cuanto al contenido en proteínas. Con respecto a la variedad, en general se obtienen valores mayores en Morisca que en Manzanilla, sobre todo en los dos primeros estados de maduración. En E3 los niveles, aunque inferiores a los de Morisca, presentan unos valores más próximos a ellos que en E1 y E2.

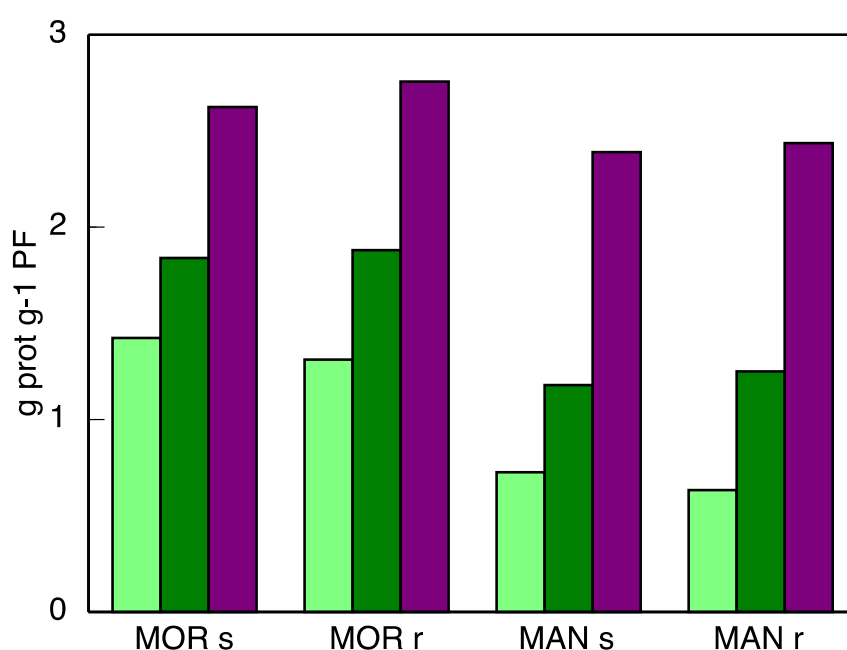


Figura 26. Contenido de proteínas en aceitunas de las variedades Morisca y Manzanilla de Sevilla en los tres estados de maduración estudiados (E1-■-, E2 -■- y E3 -■-), en secano (s) y regadío (r). Los datos son medias de los tres años medidos.

Respecto a los resultados de este apartado, se puede concluir que la **relación PS/PF** se mantiene prácticamente constante durante todos los estados de maduración de las aceitunas estudiados. No se observan alteraciones de esta relación que sean dependientes ni de la variedad ni del año, tan sólo se puede observar una cierta influencia de aporte de riego, obteniéndose una menor relación PS/PF en las aceitunas procedentes de regadío, como por otra parte era de esperar al aumentar el contenido hídrico de estas aceitunas.

En cuanto al **contenido total de aminoácidos solubles y proteínas** se observa un comportamiento similar de ambos componentes, como por otra parte es normal dada su estrecha relación. Hay un incremento de ambos con el estado de maduración, obteniéndose los niveles más altos de estos compuestos en el estado E3. Este resultado contrasta con el descrito por Zamora et al. (2001) en las variedades Arbequina y Picual, ya que en este caso no observan incrementos significativos en el contenido proteico durante la maduración, aunque no obstante en la variedad Arbequina sí se produce un ligero incremento de estos componentes. No obstante, los datos descritos por estos autores en estas dos variedades deberían ser tomados con precaución ya que en su estudio sólo consideran los datos obtenidos a partir de un único año, mientras que en este trabajo son 3 los años estudiados. El comportamiento en un año aislado puede ser muy diferente al que se observa en otro, debido a las influencias que los factores externos pueden tener. Así, los datos de estos autores serían muy similares a los aquí descritos para el año 2013 en ambas variedades, y muy similares a los que presenta la variedad Morisca en 2012. Es importante resaltar que en el caso de experiencias con olivo en campo, la evolución de los parámetros es muy dispar, dependiendo de una gran cantidad de factores ambientales difíciles de controlar y que determinan las características fisiológicas de este cultivo. Así, Ebrahimzadeh et al. (2003) en la variedad Zard pero en localizaciones muy diferentes observa la existencia de lo que denomina años “on” y “off” donde los niveles de proteínas totales en las aceitunas varía de forma muy considerable; además, dentro de esta variedad, dependiendo de la localización geográfica el contenido proteico total es muy diferente, lo que nuevamente viene a demostrar la gran influencia de las condiciones ambientales en su conjunto, incluyendo las edáficas y de cultivo. En el trabajo de Ebrahimzadeh et al. (2003) el contenido total de proteínas se incrementa con la maduración, al igual que en este trabajo. Datos similares son obtenidos por Ortega-García et al. (2008) en la variedad Picual, donde también describen un claro incremento en el contenido proteico de las aceitunas con la maduración.

Además, en este estudio, la variedad parece tener influencia en el contenido proteico. Así, la variedad Morisca muestra mayores contenidos tanto en aminoácidos solubles como en proteínas que la variedad Manzanilla, independientemente del estado de maduración. Las condiciones de secano o regadío que se han estudiado no

presentan efecto diferencial alguno sobre los contenidos de ambos tipos de compuestos. Este comportamiento dependiente de la variedad es propuesto como un nuevo marcador varietal, tanto a nivel de contenido en pulpa como posteriormente en los aceites obtenidos (Montealegre et al., 2010). Por todo ello, se puede concluir que el contenido proteico y su evolución en las aceitunas con la maduración es un parámetro muy variable, dependiendo de gran cantidad de factores externos, siendo dependiente de la variedad.

3. Oxidación NADH y producción de O_2^-

Se ha determinado la capacidad de oxidación de NADH y la producción de O_2^- por las aceitunas de ambas variedades (Morisca y Manzanilla) cultivadas en condiciones de secano y regadío en los tres años de estudio.

La **capacidad de oxidación de NADH** en las aceitunas (figura 27) es muy variable, no siguiendo un patrón definido ni en función de la variedad, ni de las condiciones, ni de la campaña. De este modo, en lo que respecta al año 2011 (figura 27A), se observa cómo en la variedad Morisca, tanto en condiciones de secano como de regadío, se produce un aumento de esta oxidación entre los estados E1 y E2, por el contrario en E3, en secano, hay una ligera bajada de esta oxidación, aunque no significativa; sin embargo, en regadío en E3 los valores de oxidación de NADH que se producen son ligeramente mayor que en E2, pero no significativamente (354,96, 506,37 y 422,02 nmoles NADH oxidado $\text{min}^{-1} \text{mg}^{-1} \text{prot}$ y 248,86, 452,53 y 506,75 nmoles NADH oxidado $\text{min}^{-1} \text{mg}^{-1} \text{prot}$ para E1, E2 y E3, para secano y regadío respectivamente). Con la variedad Manzanilla se obtiene el efecto contrario, conforme aumenta el estado de maduración disminuye la oxidación de NADH, con resultados similares en el caso de secano y de regadío, salvo que en secano la bajada en E3 es mayor.

Cuando se analiza el año 2012 (figura 27B), se observan diferencias entre las dos variedades, las diferentes condiciones y los estados de maduración. En cuanto a la variedad Morisca en condiciones de secano, E1 presenta valores bajos (444,14 nmoles

NADH oxidado $\text{min}^{-1} \text{mg}^{-1} \text{prot}$), E3 presenta valores elevados (902,58 nmoles NADH oxidado $\text{min}^{-1} \text{mg}^{-1} \text{prot}$), mientras que E2 alcanza valores anormalmente altos, alcanzando 2.079,67 nmoles NADH oxidado $\text{min}^{-1} \text{mg}^{-1} \text{prot}$. En condiciones de regadío, el perfil es el mismo, aunque E2 no presenta un valor tan elevado como en las condiciones de secano, así, los valores oscilan entre 478,41 en E1 y 1.144,01 nmoles NADH oxidado $\text{min}^{-1} \text{mg}^{-1} \text{prot}$ en E2, siendo la diferencia estadísticamente significativa. El estado E3 presenta valores de 754,61 nmoles NADH oxidado $\text{min}^{-1} \text{mg}^{-1} \text{prot}$, no siendo la diferencia significativa ni con E1 ni con E2. Al analizar la variedad Manzanilla, en condiciones de secano no existen diferencias entre los distintos estados, registrándose valores que oscilan entre 787,45 y 1.034,70 nmoles NADH oxidado $\text{min}^{-1} \text{mg}^{-1} \text{prot}$. En cambio, en condiciones de regadío, el estado E1 presenta valores bajos (390,69 nmoles NADH oxidado $\text{min}^{-1} \text{mg}^{-1} \text{prot}$), frente a los estados E2 y E3, donde los valores son semejantes: 955,14 y 856,83 nmoles NADH oxidado $\text{min}^{-1} \text{mg}^{-1} \text{prot}$ para E2 y E3, respectivamente.

Por último, en el año 2013 (figura 27C), de nuevo existe gran variabilidad en los valores registrados, no mostrando ninguno de los estados ni condiciones un patrón definido. De este modo, la variedad Morisca en secano presenta valores significativamente diferentes entre los tres estados, siendo el más bajo el correspondiente al estado E3 (186,93 nmoles NADH oxidado $\text{min}^{-1} \text{mg}^{-1} \text{prot}$), y el más alto E2 (1.146,78 nmoles NADH oxidado $\text{min}^{-1} \text{mg}^{-1} \text{prot}$). En condiciones de regadío, se observa un aumento, estadísticamente significativo, de esta actividad, con el estado de maduración (324,46; 677,86 y 1206,04 nmoles NADH oxidado $\text{min}^{-1} \text{mg}^{-1} \text{prot}$, para E1, E2 y E3, respectivamente). En cuanto a la variedad Manzanilla, en condiciones de secano, presenta valores significativamente diferentes entre los estados, siendo el valor más bajo para E1 (308,05 nmoles NADH oxidado $\text{min}^{-1} \text{mg}^{-1} \text{prot}$), y el más alto para E2 (1272,36 nmoles NADH oxidado $\text{min}^{-1} \text{mg}^{-1} \text{prot}$) mostrando E3 un valor intermedio (624,53 nmoles NADH oxidado $\text{min}^{-1} \text{mg}^{-1} \text{prot}$). En condiciones de regadío, encontramos un comportamiento semejante, con valores bajos en E1 (345 nmoles NADH oxidado $\text{min}^{-1} \text{mg}^{-1} \text{prot}$), aunque los valores para E2 y E3 son semejantes (749,01 y 716,62 nmoles NADH oxidado $\text{min}^{-1} \text{mg}^{-1} \text{prot}$).

Teniendo en cuenta los tres años estudiados conjuntamente (figura 28), en todos los casos, la oxidación de NADH aumenta en el estado E2 respecto a E1 y, en condiciones de secano en ambas variedades, la oxidación de NADH disminuye en el estado más maduro E3 respecto de E2. En condiciones de regadío hay poca diferencia entre el estado E2 y E3. Según esto parece que esta actividad varía con el estado de maduración y con las condiciones de cultivo. Entre ambas variedades no parece haber diferencias.

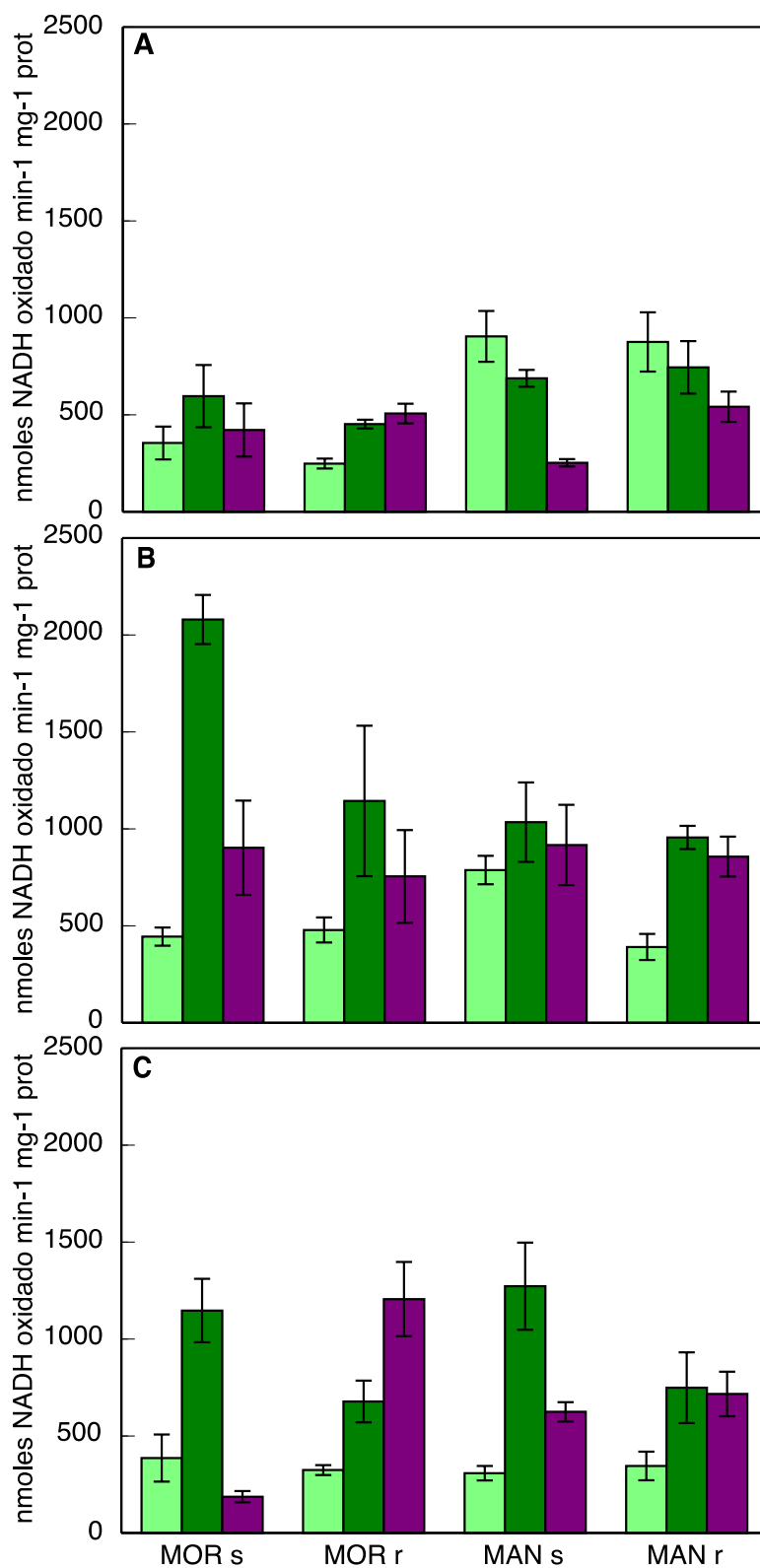


Figura 27. Oxidación de NADH en aceitunas de las variedades Morisca y Manzanilla de Sevilla en los tres estados de maduración estudiados (E1-■-, E2 -■- y E3 -■-), en seco (s) y regadío (r), durante los años 2011 (A), 2012 (B) y 2013 (C). Los datos son medias±SD de, al menos, 5 repeticiones independientes, realizadas por triplicado.

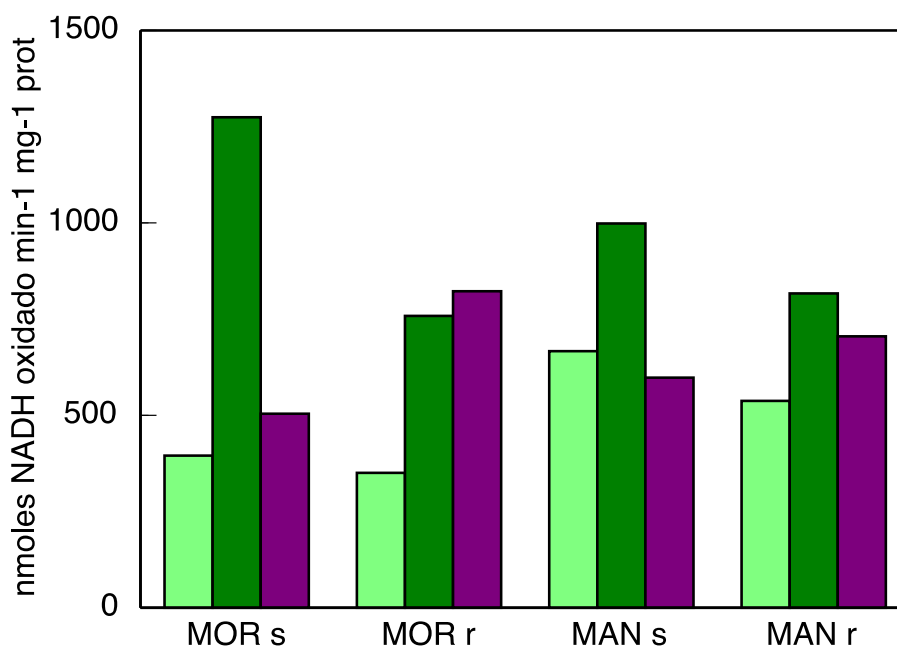


Figura 28. Oxidación de NADH en aceitunas de las variedades Morisca y Manzanilla de Sevilla en los tres estados de maduración estudiados (E1-■-, E2 -■- y E3 -■-), en seco (s) y regadío (r). Los datos son medias de los tres años medidos.

En la figura 29 se representa la **producción de $O_2^{\cdot -}$** en los diferentes años medidos, de las variedades Morisca y Manzanilla, en seco y regadío. También en la producción de $O_2^{\cdot -}$ se observa la ausencia de un patrón claramente definido. Los valores obtenidos en el año 2012 fueron superiores a los de los años 2011 y 2013. Así, en el año 2011 (figura 29A) la variedad Morisca presenta, en condiciones de seco, en el estado E1 la mayor actividad (309,92 nmoles de adrenocromo $\text{min}^{-1} \text{mg}^{-1} \text{prot}$), disminuyendo posteriormente con la maduración, no encontrándose diferencias significativas entre los estados E2 y E3. La misma variedad en condiciones de regadío muestra similar producción de $O_2^{\cdot -}$ en los estados E1 y E2, (148,03 y 158,89 nmoles de adrenocromo $\text{min}^{-1} \text{mg}^{-1} \text{prot}$, respectivamente); E3, en estas condiciones, presenta un incremento de esta actividad (280,07 nmoles de adrenocromo $\text{min}^{-1} \text{mg}^{-1} \text{prot}$). Respecto a la variedad Manzanilla, en seco, los dos primeros estados muestran valores similares (393,19 y 355,66 nmoles de adrenocromo $\text{min}^{-1} \text{mg}^{-1} \text{prot}$, para E1 y E2, respectivamente), descendiendo fuertemente en E3 (61,2 nmoles de adrenocromo $\text{min}^{-1} \text{mg}^{-1} \text{prot}$). En regadío, el valor más alto se obtiene en E1 (392,77 nmoles de adrenocromo $\text{min}^{-1} \text{mg}^{-1} \text{prot}$), mientras que E2 y E3 presentan menor actividad, siendo muy similares entre ellas (202,67 y 225,84 nmoles de adrenocromo $\text{min}^{-1} \text{mg}^{-1} \text{prot}$, respectivamente). La variedad Manzanilla muestra valores más altos que la

Morisca, excepto en E3 en secano, donde se observan niveles más altos de producción de O_2^- , indicativo posiblemente de una mayor susceptibilidad de esta variedad al estrés hídrico.

El año 2012 se caracteriza por presentar unos valores y comportamientos muy diferentes a los descritos anteriormente (figura 29B). La variedad Morisca, en secano, presenta en E1 los valores más bajos de producción de O_2^- , (258,58 nmoles de adrenocromo $\text{min}^{-1} \text{mg}^{-1} \text{prot}$), pero en E2 se produce un fuerte incremento (1.053,67 nmoles de adrenocromo $\text{min}^{-1} \text{mg}^{-1} \text{prot}$); en el E3, esta actividad desciende, aunque sigue siendo superior a la de E1 (433,27 nmoles de adrenocromo $\text{min}^{-1} \text{mg}^{-1} \text{prot}$). En condiciones de regadío, también se observa una mayor actividad en el estado E2 aunque con muy poca diferencia respecto de los otros estados de maduración (496,70; 638,87 y 531,26 nmoles de adrenocromo $\text{min}^{-1} \text{mg}^{-1} \text{prot}$ para E1, E2 y E3, respectivamente). La variedad Manzanilla, tanto en secano como en regadío, presenta valores semejantes en los tres estados de maduración, muy inferiores en todos los casos a los de Morisca en idénticas condiciones.

Por último, en el año 2013 (figura 29C) la variedad Morisca en secano presenta niveles de producción de O_2^- en E1 y E2 con pocas diferencias (251,88 y 333,65 nmoles de adrenocromo $\text{min}^{-1} \text{mg}^{-1} \text{prot}$), presentando menor actividad en E3 (104,11 nmoles de adrenocromo $\text{min}^{-1} \text{mg}^{-1} \text{prot}$). En regadío muestra actividades semejante en los primeros estados de maduración, E1 y E2 (252,08 y 273,27 nmoles de adrenocromo $\text{min}^{-1} \text{mg}^{-1} \text{prot}$), con resultados además muy similares en ambas condiciones de cultivo; sin embargo, en E3 hay al contrario de lo que sucede en secano, un aumento de producción de O_2^- (432,04 nmoles de adrenocromo $\text{min}^{-1} \text{mg}^{-1} \text{prot}$). Respecto a la variedad Manzanilla, se obtienen resultados muy parecidos entre estados de madurez y entre secano y regadío, destacar que, en ambas condiciones se obtienen valores ligeramente superiores en el estado E2. Muy similares en todos los casos a los datos mostrados para Morisca excepto en E3, donde se observan diferencias significativas entre las dos variedades, no influyendo el tipo de cultivo.

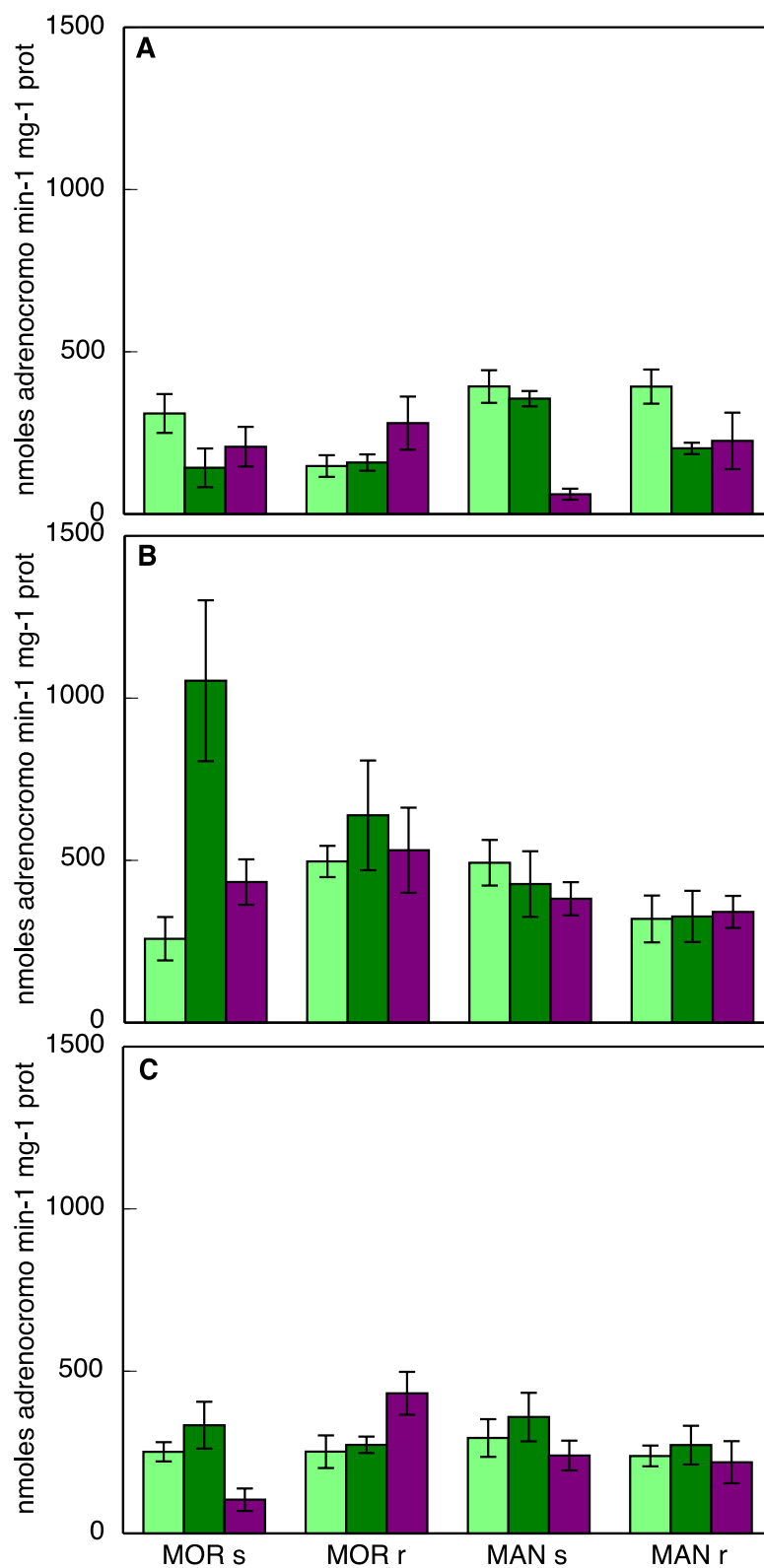


Figura 29. Producción de $O_2^{\bullet-}$ en aceitunas de las variedades Morisca y Manzanilla de Sevilla en los tres estados de maduración estudiados (E1-■-, E2 -■- y E3 -■-), en seco (s) y regadío (r), durante los años 2011 (A), 2012 (B) y 2013 (C). Los datos son medias \pm SD de, al menos, 5 repeticiones independientes, realizadas por triplicado.

Agrupando los tres años estudiados (figura 30), los resultados obtenidos, en el caso de la variedad Morisca, son similares a los descritos para la oxidación del NADH: en seco hay mucha más actividad en el estado E2, siendo la actividad en E1 y E3 similar entre ellas. En condiciones de regadío esta actividad aumenta con el estado de maduración. Con respecto a la variedad Manzanilla la producción de O_2^- es menor, en las aceitunas menos maduras, sobre todo en seco, puesto que en condiciones de regadío, esta actividad parece no cambiar con el estado de maduración.

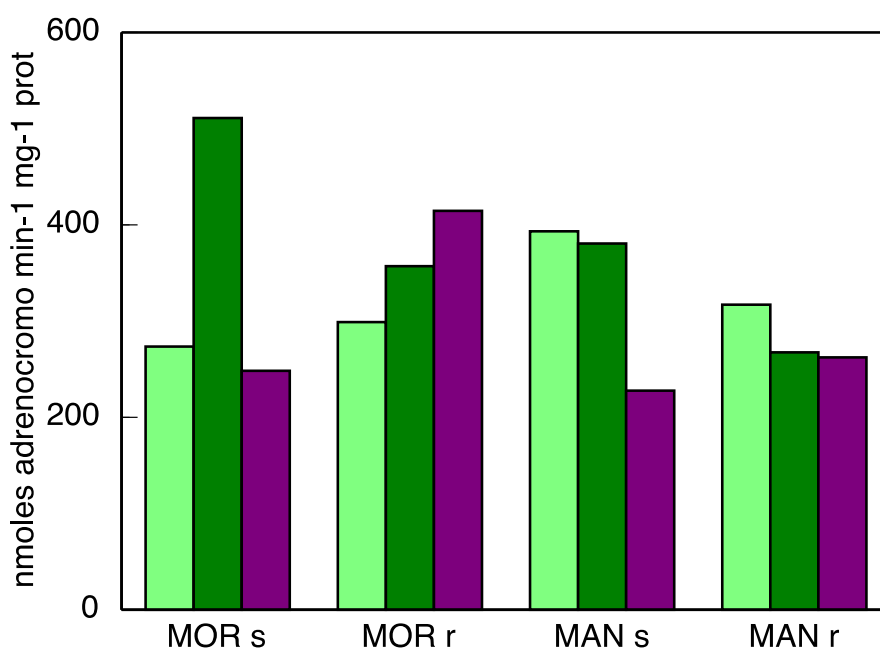


Figura 30. Producción de O_2^- en aceitunas de las variedades Morisca y Manzanilla de Sevilla en los tres estados de maduración estudiados (E1-■-, E2 -■- y E3 -■-), en seco (s) y regadío (r). Los datos son medias de los tres años medidos.

Respecto a los resultados de este apartado, se puede concluir que la **capacidad de oxidación de NADH** por las aceitunas muestra fuertes variaciones como consecuencia de la variedad (sobre todo en el año 2011) y del año, mientras que las condiciones de aporte de riego no presentan claras diferencias. En cuanto al estado de maduración tampoco se observa un comportamiento definido, obteniéndose fluctuaciones en algunos casos, mientras que en otros se mantiene prácticamente constante. En conjunto, los 3 años estudiados se observa cómo únicamente hay una cierta influencia del cultivo en seco en relación al grado de maduración. Así, la

mayor oxidación de NADH se presenta en secano en el estado E2, con mayor incidencia en la variedad Morisca que en Manzanilla.

Muy relacionada con esta actividad de oxidación de NADH se encuentra la **formación de $O_2^{\cdot-}$** . En este caso se observan alteraciones similares a las descritas anteriormente, sin tendencia clara y sin un claro efecto de alguno de los factores estudiados en cuanto a determinar su evolución. Los niveles de producción de $O_2^{\cdot-}$ son bastante similares con excepción de la variedad Morisca. Así, en 2011 se observa cómo en E3 esta variedad en secano presenta una mayor producción de $O_2^{\cdot-}$. En 2012, se observa una mayor producción en Morisca, con fuerte incidencia de las condiciones de secano y de maduración, siendo en E2 donde se alcanzan los valores máximos. En 2013 no se observan diferencias claras dependientes ni de la variedad y ni del tipo de cultivo. Es el estado de maduración el que parece tener cierta influencia, y así en la variedad Morisca en regadío se incrementan con la maduración, mientras que en secano y probablemente a respuesta al mismo, se observa un incremento inicial con posterior descenso en E3. La variedad Manzanilla muestra descensos ligeros con la maduración, o situaciones estables.

La producción de $O_2^{\cdot-}$ en el conjunto de los 3 años muestra una evolución similar a la oxidación de NADH. La RboH (NADH oxidasas del plasmalema) es la encargada de la generación de $O_2^{\cdot-}$, con NADH como donador de electrones. Kan et al. (2010) y Kumar et al. (2011) describen cómo la producción de $O_2^{\cdot-}$ y H_2O_2 en los frutos se incrementa en los estadios intermedios de maduración, con posterior descenso en la fase final de maduración. Importante destacar cómo en la fase intermedia, donde se produce el incremento tanto de $O_2^{\cdot-}$ como de H_2O_2 , la función que pueden desarrollar es la de actuar como moléculas señal, mientras que en la fase final de la maduración el incremento en la cantidad de H_2O_2 puede producir efectos tóxicos, tal y como mantiene Huan et al. (2016), lo que llevaría a la necesidad, en estas fases finales de la maduración, de controlar muy estrictamente los niveles de estas especies reactivas del oxígeno (ROS), control llevado a cabo por los sistemas antioxidantes. Estos resultados son bastante similares a los descritos anteriormente. Además, es posible que las diferencias que se observan en los diferentes años y entre las condiciones de cultivo sean consecuencia de factores ambientales que influyen en estos procesos oxidativos,

y no sólo influiría el estado de maduración o la variedad. En respuesta a los estreses ambientales se producen un choque oxidativo, que desencadena la respuesta antioxidante de las células para recuperar el equilibrio redox y que puede provocar un estrés oxidativo de no poder controlar esta producción de ROS (Sgherri et al., 2003; Kumar et al., 2011; Mittler, 2017).

4. Actividades enzimáticas antioxidantes: SOD y POD

En la figura 31 se muestran los datos relativos a la **actividad SOD** de las aceitunas de ambas variedades y en las diferentes condiciones experimentales, mostrando nuevamente la gran variabilidad que se obtiene en los diferentes años. En el año 2011 (figura 31A), en la variedad Morisca no hay diferencias de actividad SOD ni entre los diferentes estados de maduración, ni por las condiciones de cultivo. Respecto a la variedad Manzanilla, la actividad SOD en condiciones de secano es igual que en regadío, en ambos casos se observa que la mayor actividad la muestran las aceituna menos maduras, disminuyendo esta actividad en aquellas más maduras, entre E2 y E3 hay poca diferencia (140,74; 58,51,15 y 66,26 U SOD mg^{-1} prot, para E1, E2 y E3, respectivamente en secano y 135,83; 59,39 y 64,86 U SOD mg^{-1} prot, para E1, E2 y E3, respectivamente en regadío).

En cuanto al año 2012 (figura 31B), la variedad Morisca tanto secano como en regadío muestran la misma pauta, E1 presenta la menor actividad SOD (67,47 y 60,65 U SOD mg^{-1} prot, para secano y regadío, respectivamente), en estados de maduración mayores esta actividad aumenta no habiendo diferencias significativas entre E2 y E3 (120,18 y 104,15 U SOD mg^{-1} prot en condiciones de secano para E2 y E3, respectivamente y 90,52 y 92,81 U SOD mg^{-1} prot en condiciones de regadío para E2 y E3, respectivamente). La variedad Manzanilla, en general, presenta más actividad SOD. Así, en secano se observa un aumento de la actividad SOD en el estado E2, para en E3 presentar menor actividad, aunque con poca diferencia con respecto al mostrado en

E1. En condiciones de regadío la pauta parece la misma que en secano aunque las diferencias entre los diferentes estados son menores.

En el análisis del año 2013 (figura 31C), se observa cómo, a veces con significación estadística, y otras sin ella, la actividad de SOD aumenta en función al estado de maduración de la aceituna. De este modo, en la variedad Morisca, tanto en condiciones de secano como en regadío, la diferencia es significativa entre E1 y E2/E3, siendo prácticamente iguales estas dos últimas (41,99; 128,34 y 129,63 U SOD mg^{-1} prot para E1, E2 y E3, respectivamente, en secano y 59,70; 105,2 y 109,57 U SOD mg^{-1} prot para E1, E2 y E3, respectivamente). Por otro lado, en la variedad Manzanilla, en condiciones de secano, muestra el mismo comportamiento descrito para Morisca; un aumento significativo de la actividad SOD entre E1 y E2/E3 (1124,04 vs 208,15 y 213,07 U SOD mg^{-1} prot para E1, E2 y E3, respectivamente). En condiciones de regadío, la actividad SOD va aumentando con el estado de maduración: 110,67; 142,32 y 195,92 U SOD mg^{-1} prot para E1, E2 y E3, respectivamente.

Al realizar las medias de todos los años (figura 32), se observa cómo, en general la actividad SOD es mayor en Manzanilla que en Morisca, en ningún caso depende esta actividad del sistema de cultivo (secano o regadío) puesto que los resultados son similares en ambas condiciones. Con respecto a la dependencia con el estado de maduración, parece que en la variedad Morisca si hay una dependencia, obteniéndose la menor actividad en las aceitunas menos maduras, aunque entre E2 y E3 no hay diferencia. La variedad Manzanilla es menos dependiente del estado de maduración, solo destacar que en secano las aceitunas en el estado E2 parecen mostrar más actividad SOD, en el resto los valores son más fluctuantes entre los estados de maduración.

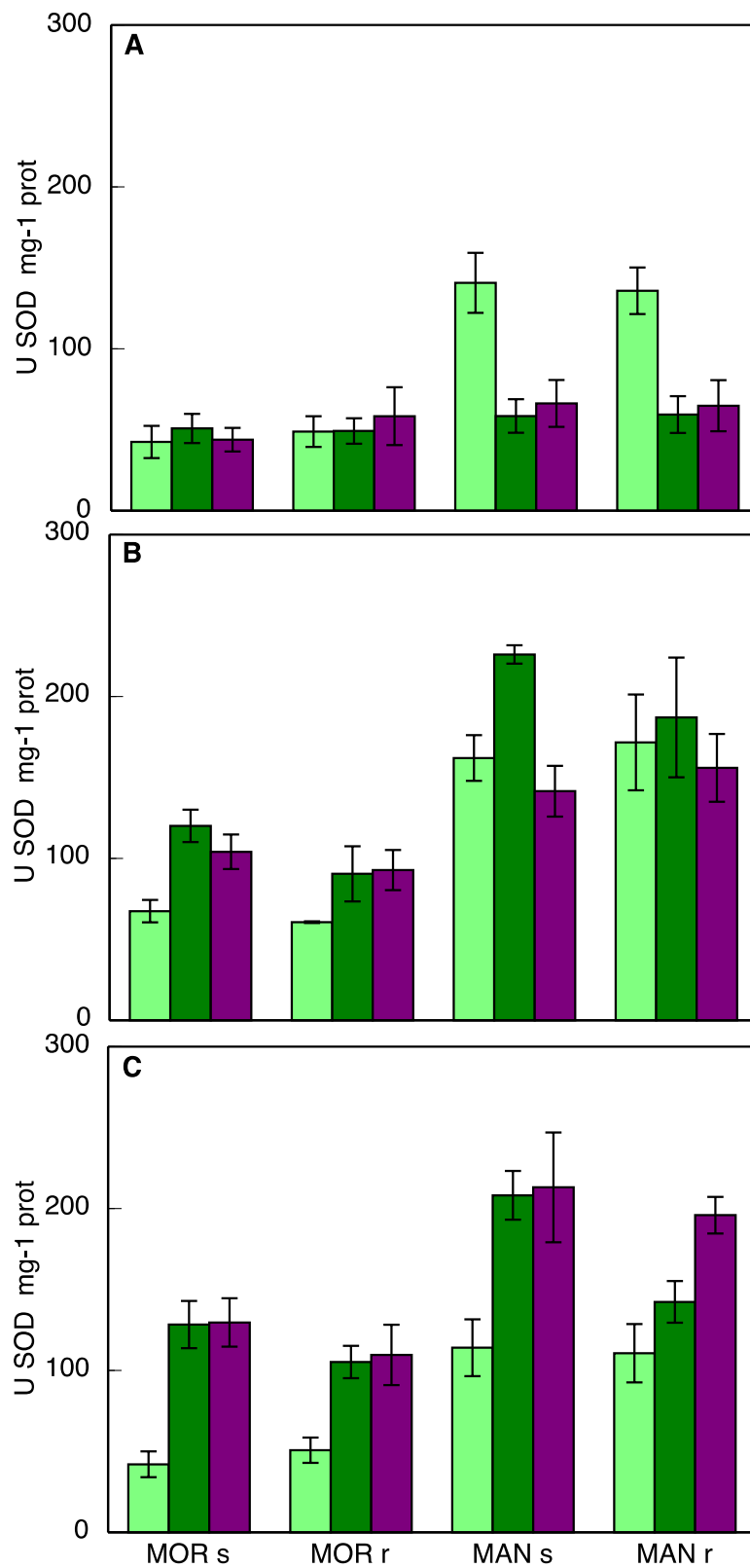


Figura 31. Actividad SOD en aceitunas de las variedades Morisca y Manzanilla de Sevilla en los tres estados de maduración estudiados (E1-■-, E2 -■- y E3 -■-), en seco (s) y regadío (r), durante los años 2011 (A), 2012 (B) y 2013 (C). Los datos son medias±SD de, al menos, 5 repeticiones independientes, realizadas por triplicado.

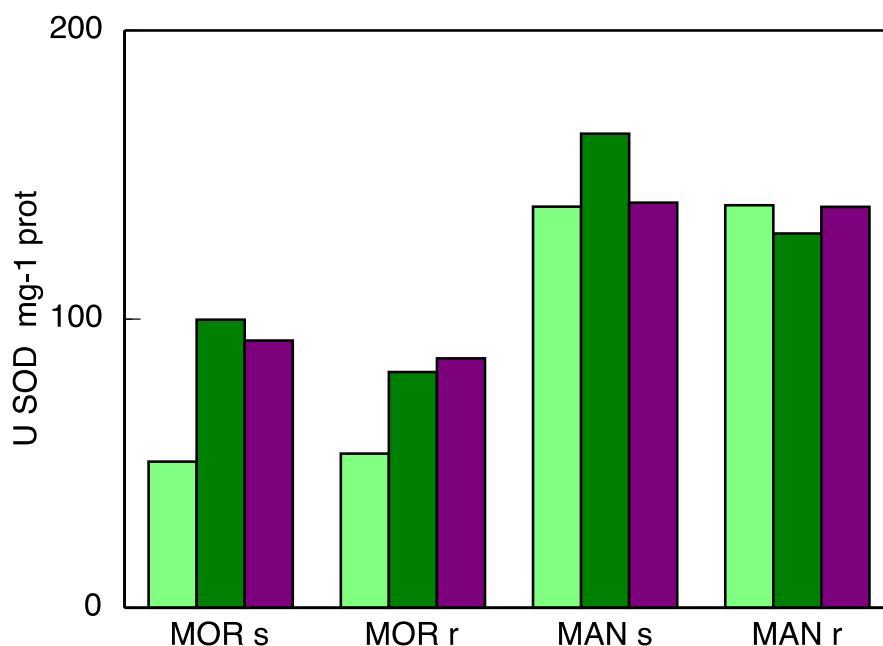


Figura 32. Actividad SOD en aceitunas de las variedades Morisca y Manzanilla de Sevilla en los tres estados de maduración estudiados (E1-■-, E2 -■- y E3 -■-), en seco (s) y regadío (r). Los datos son medias de los tres años medidos.

Se ha medido también **la actividad POD**, en la figura 33 se muestran los datos obtenidos en los 3 años estudiados. Como puede verse, en el año 2011 (figura 33A) la actividad POD de las aceitunas Morisca, tanto en condiciones de seco como de regadío, aumenta significativamente del estado E1 al E2; sin embargo, en E3 ambas condiciones tienen un comportamiento diferente y así mientras en seco baja esta actividad, en regadío prácticamente no varía en relación a la actividad en E2. Respecto a la variedad Manzanilla, tanto en seco como en regadío muestran el mismo comportamiento respecto a la actividad POD, una disminución conforme aumenta el estado de maduración de las aceitunas.

En el año 2012 (figura 33B), la variedad Morisca tiene un comportamiento semejante tanto en seco como en regadío con respecto a la actividad POD. Se observa un fuerte aumento de esta actividad desde estado E1 al E2, para después en aceitunas más maduras (E3) disminuir. En condiciones de seco esta actividad POD en E3 sigue siendo superior a la mostrada en el estado E1 (161,96 y 106,97 nmoles DMAB-MBTH min⁻¹ mg⁻¹ prot para E3 y E1, respectivamente); sin embargo, en regadío la actividad en E3 cae a niveles inferiores a los de E1 (100,68 y 153,41 nmoles DMAB-MBTH min⁻¹ mg⁻¹ prot para E3 y E1, respectivamente). En la variedad Manzanilla en

secano se observa cómo la actividad POD disminuye con la maduración (205,69; 143,28 y 99,90 nmoles DMAB-MBTH min⁻¹ mg⁻¹ prot para E1, E2 y E3, respectivamente). Este comportamiento se ve algo atenuado en regadío, y así en E1 y E2 muestran prácticamente la misma actividad, disminuyendo sólo en E3 (167,27, 164,66 y 73,59 nmoles DMAB-MBTH min⁻¹ mg⁻¹ prot, para E1, E2 y E3, respectivamente).

En el año 2013 (figura 33C) la variedad Morisca en seco muestra un fuerte incremento en la actividad POD del estado E1 a E2 (el doble), pero en E3 esta actividad cae considerablemente a niveles menores que los alcanzados en E1. En condiciones de regadío también hay un aumento de la actividad de E1 a E2, si bien en esta condición de cultivo en E3 se mantiene una actividad alta (56,17; 165,48 y 158,41 nmoles DMAB-MBTH min⁻¹ mg⁻¹ prot para E1, E2 y E3, respectivamente). Respecto a la variedad Manzanilla no hay variación entre el comportamiento mostrado en condiciones de seco respecto a las de regadío, en ambos casos la actividad POD aumenta desde el estado E1 al E2, disminuyendo en E3: 52,39; 180,59 y 71,57 nmoles DMAB-MBTH min⁻¹ mg⁻¹ prot para E1, E2 y E3, respectivamente en seco y 46,16; 177,92 y 65,70 nmoles DMAB-MBTH min⁻¹ mg⁻¹ prot para E1, E2 y E3, respectivamente en regadío).

Al realizar las medias de los diferentes años estudiados (figura 34) se puede observar que en la variedad Morisca no hay prácticamente diferencias en la actividad POD, entre seco y regadío, si entre los diferentes estados de maduración, obteniéndose el valor más bajo, de esta actividad en el estado menos maduro, y el más alto en el E2, mientras que E3 presenta una disminución pero con valores iguales a E1 en seco e intermedios entre E1 y E2 en regadío. La variedad Manzanilla, tampoco muestra una diferencia considerable entre seco y regadío, pero su comportamiento es ligeramente diferente a la variedad Morisca, en este caso, la mayor actividad POD también la muestran las aceitunas en el estado E2, aunque con poca variación (sobre todo en las condiciones de seco) respecto del estado E1, la menor actividad se encuentra en el estado E3.

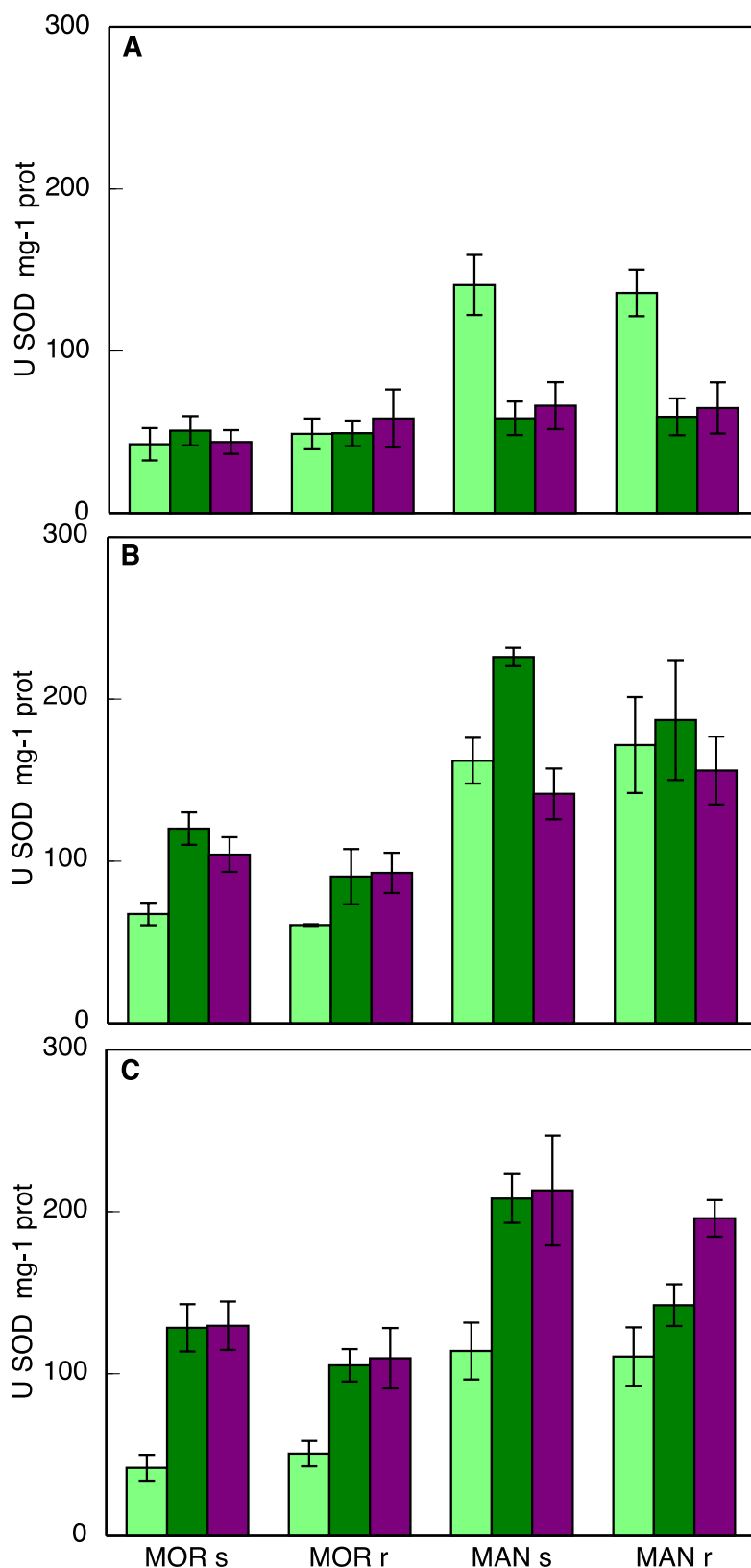


Figura 33. Actividad POD en aceitunas de las variedades Morisca y Manzanilla de Sevilla en los tres estados de maduración estudiados (E1-■-, E2 -■- y E3 -■-), en seco (s) y regadío (r), durante los años 2011 (A), 2012 (B) y 2013 (C). Los datos son medias±SD de, al menos, 5 repeticiones independientes, realizadas por triplicado.

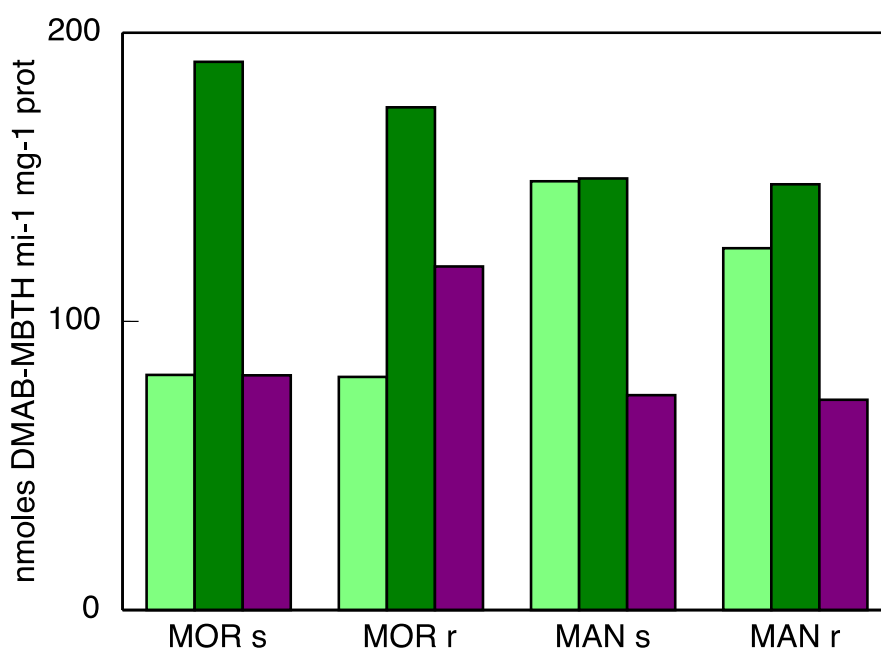


Figura 34. Actividad POD en aceitunas de las variedades Morisca y Manzanilla de Sevilla en los tres estados de maduración estudiados (E1-■-, E2 -■- y E3 -■-), en seco (s) y regadío (r). Los datos son medias de los tres años medidos.

De este apartado se puede concluir que el control de los niveles de O_2^- y el mantenimiento de la homeostasis redox celular implica la actuación de los sistemas antioxidantes, entre ellos la SOD y las POX. La actividad SOD determinada muestra un comportamiento claramente dependiente de la variedad estudiada. Así, la variedad Manzanilla presenta niveles de actividad SOD mucho más altos que la variedad Morisca (el doble). En ambas variedades se observa un incremento, aunque no significativo estadísticamente, como consecuencia del cultivo en seco. También se observan fluctuaciones a lo largo de la maduración, sin un patrón definido. En conjunto, los datos medios de actividad de los 3 años muestran cómo en seco se produce un incremento con la maduración hasta E2, descendiendo en estado maduro, E3. En regadío el descenso final es menos acusado o no se produce.

La evolución de la actividad SOD descrita anteriormente es muy similar al obtenido en las variedades Gordal y Manzanilla por Hornero-Méndez et al., (2002). Estos autores atribuyen la mayor actividad SOD observada en Gordal a una mayor susceptibilidad de esta variedad al estrés oxidativo, lo que induce una mayor actividad SOD como defensa frente al desarrollo del daño oxidativo. En nuestro caso la variedad

Morisca es la que produce mayor cantidad de O_2^- , pero muestra menores niveles de actividad SOD, lo que parece indicar la participación de algún otro sistema de defensa (mayor cantidad de flavonoides y PPGs) frente al daño oxidativo y bien una menor sensibilidad a este daño por esta variedad. La variedad Manzanilla para niveles de O_2^- más bajos, sin embargo incrementa considerablemente la actividad SOD, lo que podría suponer que esta variedad es más sensible a este tipo de estrés y requiere un rápido y efectivo control del mismo.

En cuanto a la actividad POD tiene un comportamiento similar en todos los años estudiados. No hay diferencias significativas respecto de las condiciones de riego, pero si respecto de la variedad y del estado de maduración. Así, en la variedad Manzanilla disminuye esta actividad a lo largo de la maduración mientras que, por el contrario, en Morisca se produce un aumento en las fases iniciales con una posterior disminución, aunque en algunos casos los valores de actividad se mantienen en E3. Estas variedades presentan un comportamiento similar al que describen en otras variedades Hbaieb et al. (2016) y García-Rodríguez et al. (2011). Sin embargo, Cirilli et al. (2017) en un estudio con la variedad Frantoio, describen descensos en la actividad POD que están ligados a la maduración, con incremento final aunque no llega a los valores iniciales, y dependientes del aporte de riego sobre todo en esta fase final en la que las aceitunas con déficit hídrico muestran menor actividad POD. Este resultado coincide con el comportamiento que observado en este trabajo en la variedad Morisca durante los años 2011 y 2013, pero no con el comportamiento de la variedad Manzanilla, ni tampoco con los datos medios de las 3 campañas para ninguna de las dos variedades.

Una situación similar a la descrita es observada a lo largo de la maduración en otros frutos, como ciruela y melocotón (Kan et al., 2010 y Kumar et al., 2011, respectivamente). Estas fluctuaciones pueden estar relacionadas con los incrementos que se producen en la cantidad de O_2^- a lo largo de la maduración, dependiendo de ellos se producirá una mayor o menor actividad SOD. Este efecto es más evidente si se toman en conjunto los datos de ambas actividades en los 3 años estudiados. Cuando se produce un incremento en la cantidad de O_2^- se produce también un aumento en la actividad SOD.

Las actividades antioxidantes SOD y POD están involucradas en los procesos que controlan el equilibrio redox (Foyer y Noctor, 2005) al estabilizar los niveles de ROS

que se producen durante la maduración y también ante los diferentes estreses ambientales a que están sometidas las aceitunas. Así, en este estudio las actividades SOD y POD evolucionan de manera muy relacionada, con fluctuaciones que son similares entre sí y, a su vez esta evolución está relacionada con la producción de ROS. Esto refleja claramente su actuación conjunta en el control de ROS y del equilibrio redox. Además, la POD interviene en un proceso clave de la evolución de las aceitunas durante su maduración como es la evolución del perfil fenólico, que se modifica a lo largo de este proceso. Así, por ejemplo está muy relacionada con el proceso de oxidación de los glucósidos fenólicos (García-Rodríguez et al., 2011). La gran variabilidad observada en las 2 variedades, durante los 3 años de estudio, en las 3 etapas de maduración y en 2 condiciones de cultivo diferentes, pueden ser debidas a la influencia conjunta de los factores endógenos como la maduración, y los exógenos como las cambiantes condiciones ambientales y diferentes estrés bióticos. En este caso, el factor que más claramente influye y discrimina en estas actividades es la maduración, si bien también dependen en gran medida del factor genético como es la variedad (Hornero-Méndez et al., 2002). La variedad Manzanilla presenta niveles más altos de actividad SOD que la Morisca, pero por el contrario, la Morisca presenta una mayor actividad POD. La influencia de los factores ambientales, como el régimen de cultivo, se refleja en unos más altos niveles de actividad SOD y POD en condiciones de secano, lo que indica cómo estas actividades están implicadas en la defensa frente al estrés ambiental, en este caso la restricción hídrica que provoca el secano frente a las parcelas de regadío. El factor régimen de cultivo afecta fuertemente a la evolución de estas actividades durante la maduración.

5. Compuestos fenólicos totales, flavonoides, fenilpropanoides glicósidos y actividad PPO

Se han realizado medidas relacionadas con el metabolismo fenólico, así se han determinado el contenido en fenoles totales, flavonoides y fenilpropanoides glicósidos (PPGs), así como la actividad de la enzima polifenol oxidasa (PPO).

En la figura 35 se representa el contenido en **fenoles totales** en los diferentes años de las variedades Morisca y Manzanilla, en secano y regadío. Al analizar los valores de fenoles en los tres años registrados, se observa una semejanza, tanto en valores como en tendencia, entre 2012 y 2013, obteniéndose valores ligeramente inferiores en 2011.

En el año 2011 (figura 35A) el contenido en fenoles aumenta levemente en función del estado de maduración, independientemente de la variedad o de la condición de cultivo. De este modo, en la variedad Morisca, tanto en condiciones de secano como de regadío, no hay diferencia entre los fenoles en el estado E1 y E2, sólo en E3 se aprecia una ligera subida (1.671,16; 1.719,12 y 2213,65 μg de ácido caféico g^{-1} PF para E1, E2 y E3, respectivamente, en secano y 1.746,05; 1.726,06 y 2.221,58 μg de ácido caféico g^{-1} PF para E1, E2 y E3, respectivamente, en regadío).

En la variedad Manzanilla hay un ligero aumento paulatino del contenido fenólico con la maduración tanto en secano como en regadío.

Un comportamiento diferente muestra el año 2012 (figura 35B), donde, para la variedad Morisca, tanto en condiciones de secano como en regadío, el contenido en fenoles es mayor en los estados E1 y E3, no habiendo diferencias significativas entre ambos, el estado E2 presenta los menores valores de fenoles totales.

Respecto a la variedad Manzanilla, tanto en secano como en regadío, como ocurre en Morisca el menor valor de contenido fenólico lo muestra el estado E2; E1 y E3 presentan mayores valores, pero, en este caso, si hay diferencias significativas entre ambos, siendo los valores mayores los mostrados en el estado E3 (3,263,97; 1999,63 y 4.077,06 μg de ácido caféico g^{-1} PF, para E1, E2 y E3, respectivamente para secano y 2.920,59; 2.257,72 y 4.323,53 μg de ácido caféico g^{-1} PF, para E1, E2 y E3, respectivamente para regadío).

Por último, en el año 2013 (figura 35C), en general no hay mucha diferencia entre el contenido fenólico en diferente variedad, condiciones de cultivo o estado de maduración. La variedad Morisca en secano y regadío, tiene los valores más altos en contenido fenólico, en el estado E1 y menores en los estados E2 y E3, aunque las diferencias, en general, son poco significativas.

En cuanto a la variedad Manzanilla, en condiciones de secano, los valores son significativamente mayores en E3, con 3.598,90 μg de ácido caféico g^{-1} PF, E1 y E2

presentan valores inferiores y semejantes entre ellos (2.937,18 y 2.817,57 μg de ácido caféico g^{-1} PF para E1 y E2, respectivamente). En condiciones de regadío, el perfil es similar al mostrado en 2012, aunque algo atenuado con valores de E1 semejantes a E2 y E3, y significativamente menores (3.347,66; 2.687,50 y 3.296,33 μg de ácido caféico g^{-1} PF, para E1, E2 y E3, respectivamente).

Los resultados de las medias de los tres años juntos (figura 36), muestran que prácticamente no hay variación con las condiciones de cultivo, si con el estado de madurez, obteniéndose el menor contenido en fenoles totales (en ambas variedades) en el estado E2. En la variedad Morisca no hay diferencia entre los estados E1 y E3 y en la variedad Manzanilla si hay diferencia entre ambos estados mostrando el mayor contenido en fenoles el estado más maduro.

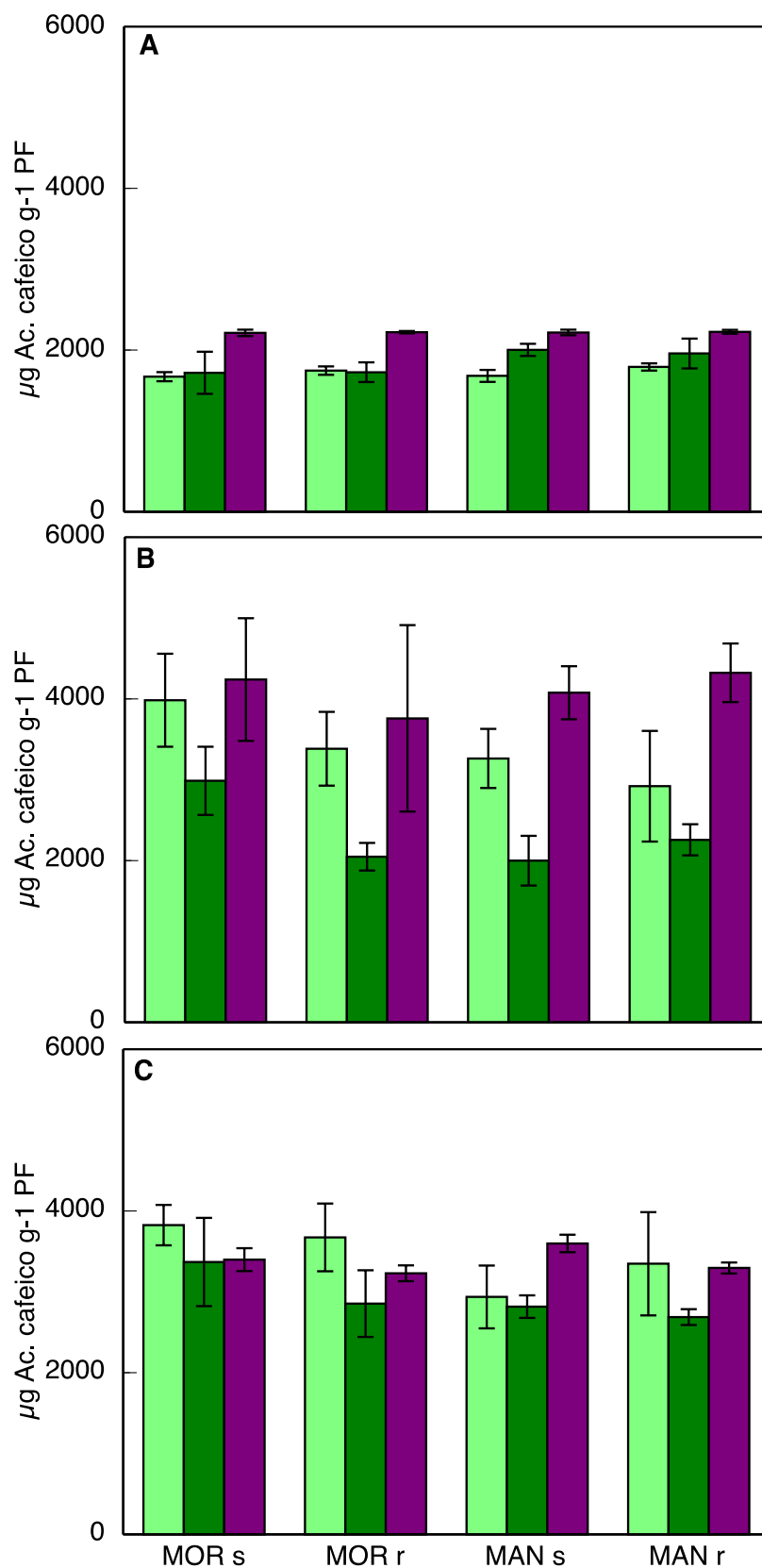


Figura 35. Contenido de fenoles totales en aceitunas de las variedades Morisca y Manzanilla de Sevilla en los tres estados de maduración estudiados (E1-■-, E2 -■- y E3 -■-), en seco (s) y regadío (r), durante los años 2011 (A), 2012 (B) y 2013 (C). Los datos son medias±SD de, al menos, 5 repeticiones independientes, realizadas por triplicado.

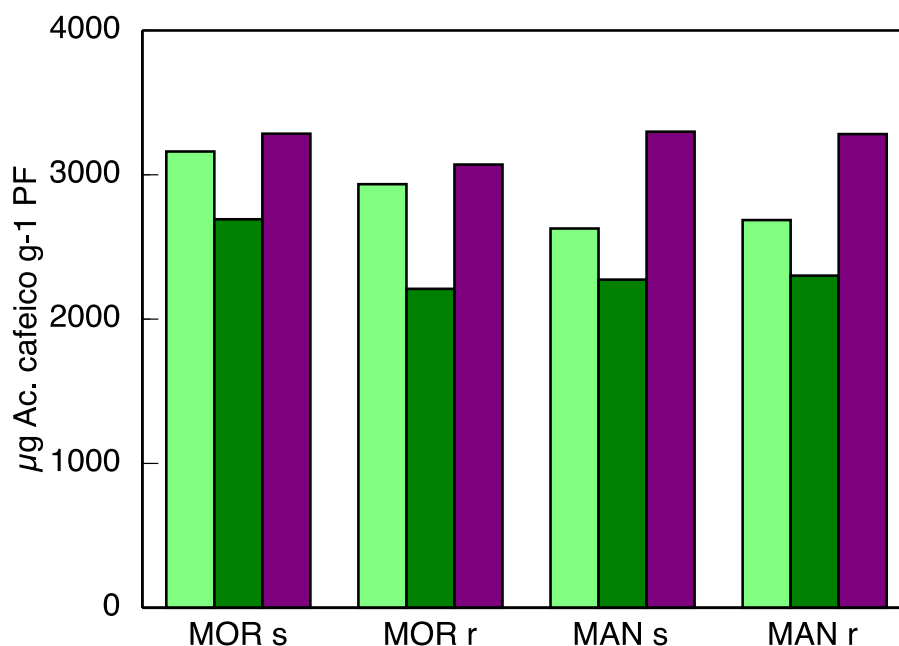


Figura 36. Contenido de fenoles totales en aceitunas de las variedades Morisca y Manzanilla de Sevilla en los tres estados de maduración estudiados (E1-■-, E2 -■- y E3 -■-), en seco (s) y regadío (r). Los datos son medias de los tres años medidos.

En la figura 37 se representa el contenido en **flavonoides** de aceitunas Morisca y Manzanilla, en seco y regadío, en los tres años estudiados. Los resultados son cualitativamente muy similares a los descritos para el contenido en fenoles totales.

En el año 2011 (figura 37A), en las dos variedades, tanto en condiciones de seco como de regadío, se obtiene, prácticamente el mismo resultado: No hay diferencias significativas entre el contenido en flavonoides en los estados E1 y E2, y en E3 se aprecia un aumento significativo.

En 2012 (figura 37B) se observa que, tanto para la variedad Morisca como para Manzanilla de seco, el menor contenido en flavonoides lo muestra el estado E2, y entre E1 y E3 no se aprecian diferencias significativas, sin embargo en el caso de Manzanilla en condiciones de regadío, en el estado E1 se obtienen valores menores que en E3 y similares a E2. Destacar, que en condiciones de seco el contenido de flavonoides es mayor que en seco: Morisca estado E1: 10.430,36 y 7.839,64 µg rutín g⁻¹ PF, en seco y regadío, respectivamente. Morisca estado E2: 6.904,11 y 4.875,00 µg rutín g⁻¹ PF, en seco y regadío, respectivamente. Morisca estado E3: 9.237,14 y 8.462,50 µg rutín g⁻¹ PF, en seco y regadío, respectivamente. Manzanilla estado E1: 7.960,89 y 5.776,79 µg rutín g⁻¹ PF, en seco y regadío, respectivamente. Manzanilla

estado E2: 5.568,57 y 5.178,10 μg rutín g^{-1} PF, en seco y regadío, respectivamente. Manzanilla estado E3: 8.799,28 y 7.895,02 μg rutín g^{-1} PF, en seco y regadío, respectivamente.

En el año 2013 (figura 37C) no se observa un patrón claro en cuanto al comportamiento contenido en flavonoides. De este modo, la variedad Morisca en condiciones de seco registra valores más altos en E1, con 8.901,00 μg rutín g^{-1} PF, e inferiores en E2 y sobre todo en E3 (8.444,28 y 7.067,32 μg rutín g^{-1} PF., respectivamente). Esta variedad en condiciones de regadío va aumentando su contenido en flavonoides conforme aumenta su estado de madurez, aunque solamente se aprecian diferencias significativas entre los estados E1 y E3; este mismo resultado lo muestra la variedad Manzanilla en condiciones de seco. Manzanilla en regadío, sin embargo, muestra el menor contenido de flavonoides, en el estado E2 y entre E1 y E3 no hay diferencias significativas. En este año se aprecia, como en 2012, mayor contenido de flavonoides en condiciones de seco que en regadío, claramente en la variedad Morisca y en la variedad Manzanilla en los estados E2 y E3 pero no en E1: Morisca estado E1: 8.901,00 y 5.539,11 μg rutín g^{-1} PF, en seco y regadío, respectivamente. Morisca estado E2: 8.444,28 y 5.629,53 μg rutín g^{-1} PF, en seco y regadío, respectivamente. Morisca estado E3: 7.067,32 y 6.182,86 μg rutín g^{-1} PF, en seco y regadío, respectivamente. Manzanilla estado E2: 6.252,57 y 4.739,05 μg rutín g^{-1} PF, en seco y regadío, respectivamente. Manzanilla estado E3: 6.849,00 y 6.218,93 μg rutín g^{-1} PF, en seco y regadío, respectivamente.

Tomando los 3 años en conjunto (figura 38), se observa que el contenido en flavonoides es, en ambas variedades y en ambas condiciones de cultivo, menor en el estado E2, sobre todo en la variedad Morisca, puesto que en Manzanilla este contenido en E2 es muy similar al que presentan las aceitunas en el estado E1. En todos los casos el mayor contenido en flavonoides lo tienen las aceitunas más maduras (aunque en Morisca de seco está igualado con E1). En esta figura también se puede apreciar, lo comentado anteriormente, que, en condiciones de seco, hay más flavonoides que en regadío, sobre todo en Morisca.

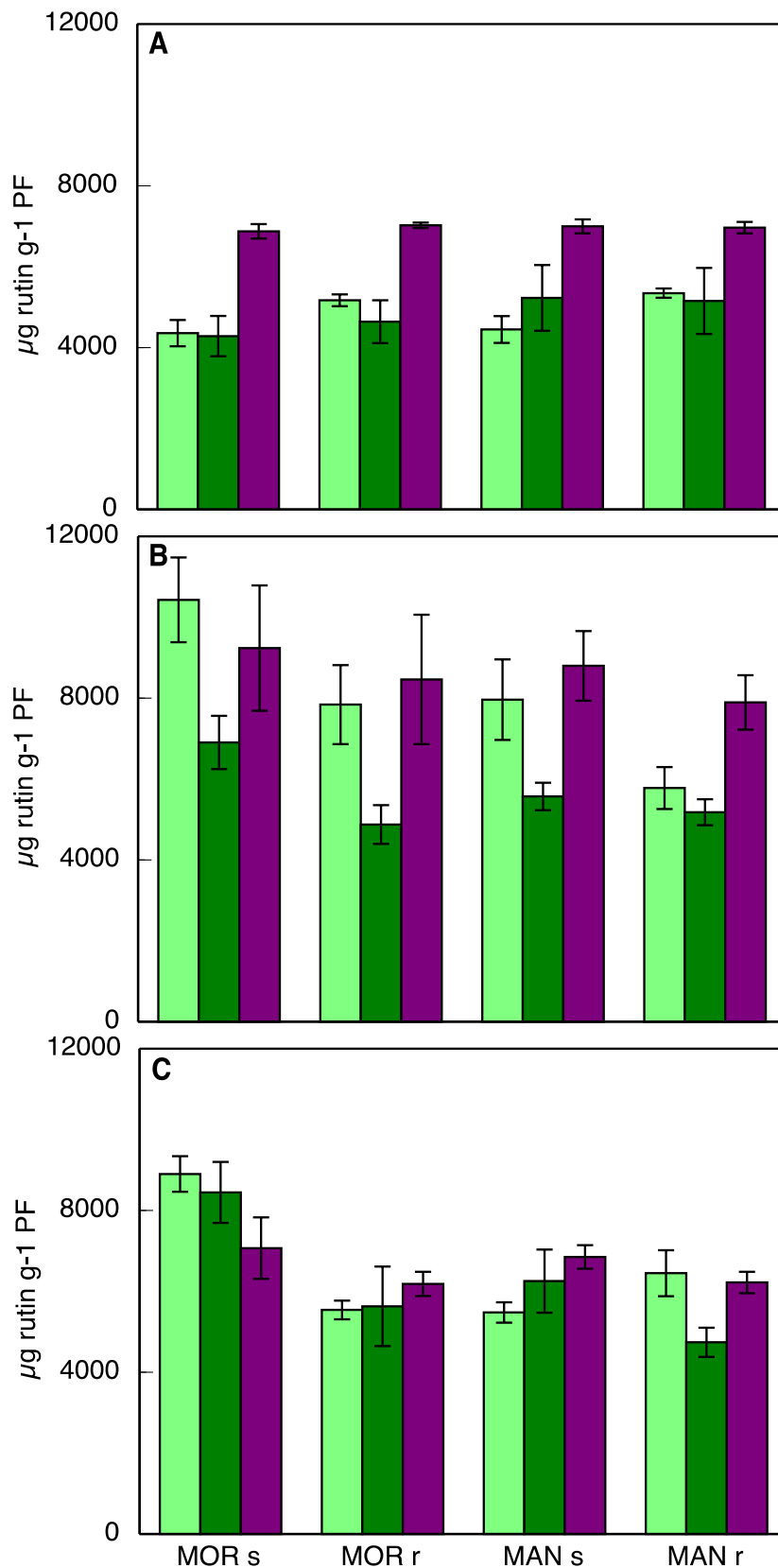


Figura 37. Contenido de flavonoides en aceitunas de las variedades Morisca y Manzanilla de Sevilla en los tres estados de maduración estudiados (E1-■-, E2 -■- y E3 -■-), en seco (s) y regadío (r), durante los 2011 (A), 2012 (B) y 2013 (C). Los datos son medias±SD de, al menos, 5 repeticiones independientes, realizadas por triplicado.

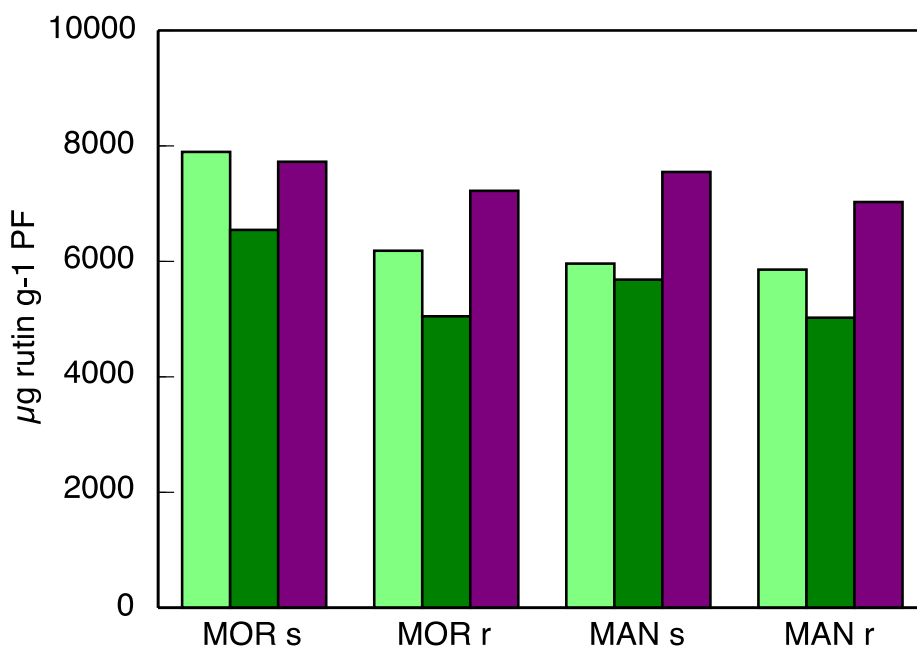


Figura 38. Contenido de flavonoides en aceitunas de las variedades Morisca y Manzanilla de Sevilla en los tres estados de maduración estudiados (E1-■-, E2 -■- y E3 -■-), en seco (s) y regadío (r). Los datos son medias de los tres años medidos.

En la figura 39 se muestra el contenido en **PPGs** de aceitunas Morisca y Manzanilla, en seco y regadío, en los tres años estudiados. Los resultados son cualitativamente muy similares a los descritos para el contenido en fenoles totales.

En el año 2011 (figura 39A), el contenido en PPGs en las dos variedades, tanto en condiciones de seco como de regadío, es similar: el estado más maduro tiene un contenido significativamente mayor con respecto a los otros estados, y el estado E2 presenta los menores valores (excepto el caso de Manzanilla en condiciones de seco), aunque con poca diferencia con E1, algo más significativa es esta diferencia en las condiciones de regadío en ambas variedades.

En el año 2012 (figura 39B), las aceitunas Moriscas, tanto en seco como en regadío, tienen mayor contenido en PPGs en el estado menos maduro (E1) y menor en E2, mostrando el estado E3 valores intermedios. Cabe destacar que las condiciones de seco muestran mayor contenido en PPGs que en regadío en todos los estados de maduración: E1: 16.208,36,36 y 14.300,13 µg verbacosido g⁻¹ PF, en seco y regadío, respectivamente. E2: 11.998,28 y 7.095,39 µg verbacosido g⁻¹ PF, en seco y regadío, respectivamente. E3: 13.571,07 y 10.050,25 µg verbacosido g⁻¹ PF, en seco y regadío, respectivamente. Respecto a la variedad Manzanilla, en general hay pocas

diferencias en el contenido de PPGs respecto al estado de maduración, en condiciones de secano se aprecia algo más de diferencias donde el menor contenido está en el estado E2 y en E1 y E3 tienen un contenido similar. En esta variedad en E1 y E3 también se aprecia que hay más contenido en PPGs cuando las aceitunas proceden de cultivo en secano respecto al de regadío: E1: 13.187,85 y 10.998,54 μg verbacosido g^{-1} PF, en secano y regadío, respectivamente. E3: 13.867,00 y 10.892,09 μg verbacosido g^{-1} PF, en secano y regadío, respectivamente. En el estado E2 no hay diferencias entre ambas condiciones de cultivo: 10.955,07 y 10.468,67 μg verbacosido g^{-1} PF, en secano y regadío, respectivamente.

En el año 2013 (figura 39C), la variedad Morisca en condiciones de secano registra valores más altos en el contenido en PPGs en el estado E1 (15.009,91 μg verbacosido g^{-1} PF), los estados E2 y E3 tienen un contenido semejante (12.134,00 y 11.705,48 μg verbacosido g^{-1} PF, respectivamente). En condiciones de regadío el contenido de PPGs es similar en los estados E1 y E2 y baja en el estado más maduro (13.527,86; 13.134,63 y 9.332,25 μg verbacosido g^{-1} PF, para E1, E2 y E3, respectivamente).

En la variedad Manzanilla en condiciones de secano hay pocas diferencias entre los diferentes estados de maduración, sólo destacar un ligero aumento de PPGs en E2. Esta variedad en regadío muestra un descenso de PPGs con el estado de maduración aunque entre E2 y E3 no hay diferencias significativas (12.304,32; 9.189,64 y 8.791,48 μg verbacosido g^{-1} PF, para E1, E2 y E3, respectivamente).

En la figura 40 se representa el contenido de PPGs de ambas variedades en los tres estados de maduración, haciendo la media de los tres años medidos, en ella se puede apreciar que el estado donde menor contenido hay es E2, excepto en el caso de la variedad Manzanilla en condiciones de secano donde E1 es similar a E2. Morisca muestra más PPGs en el estado menos maduro y Manzanilla en el más maduro. También cabe destacar que en estas medias se aprecia que, en condiciones de secano, este contenido es mayor que en condiciones de regadío.

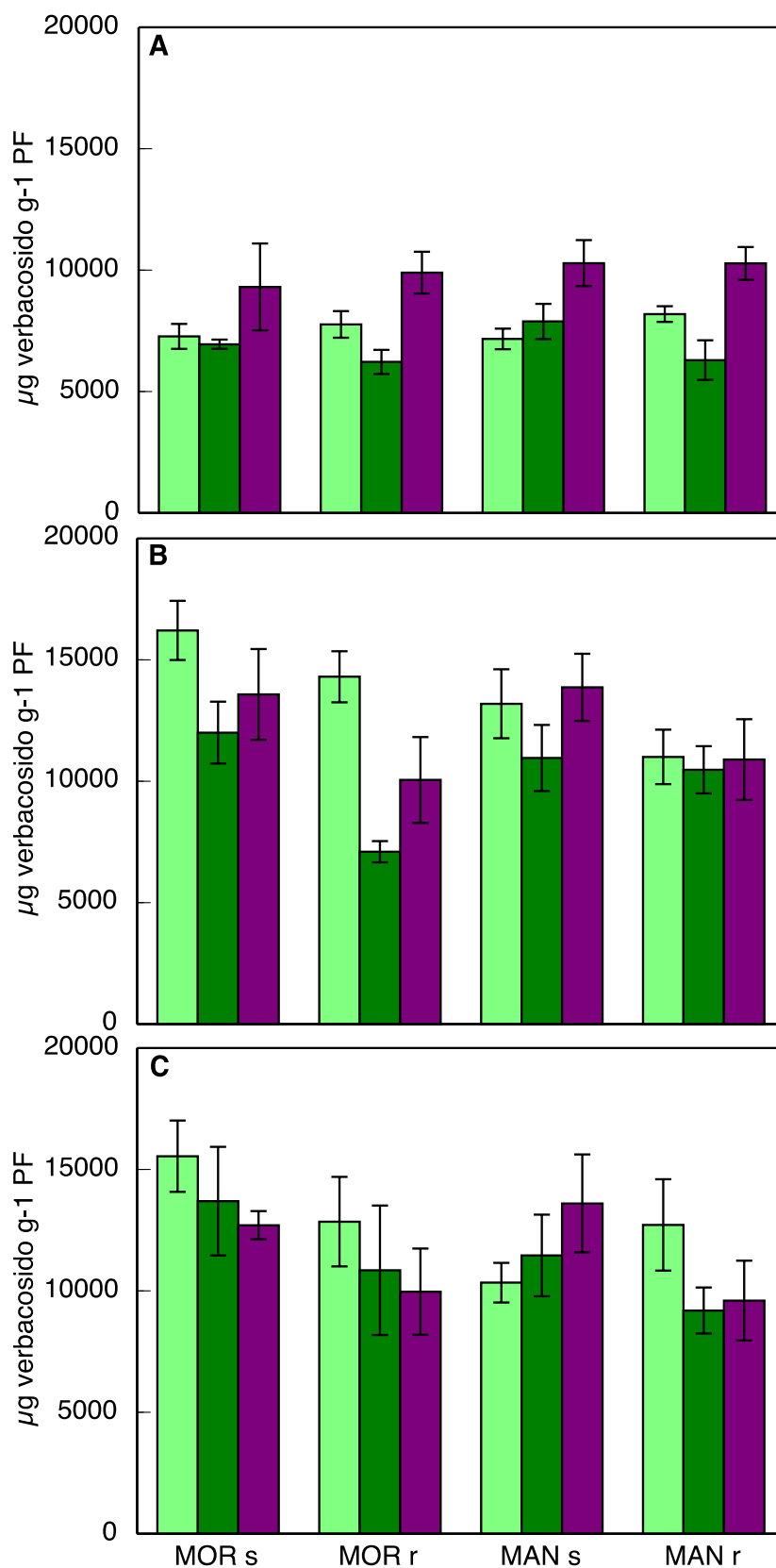


Figura 39. Contenido de PPGs en aceitunas de las variedades Morisca y Manzanilla de Sevilla en los tres estados de maduración estudiados (E1-■-, E2 -■- y E3 -■-), en seco (s) y regadío (r), durante los 2011 (A), 2012 (B) y 2013 (C). Los datos son medias±SD de, al menos, 5 repeticiones independientes, realizadas por triplicado.

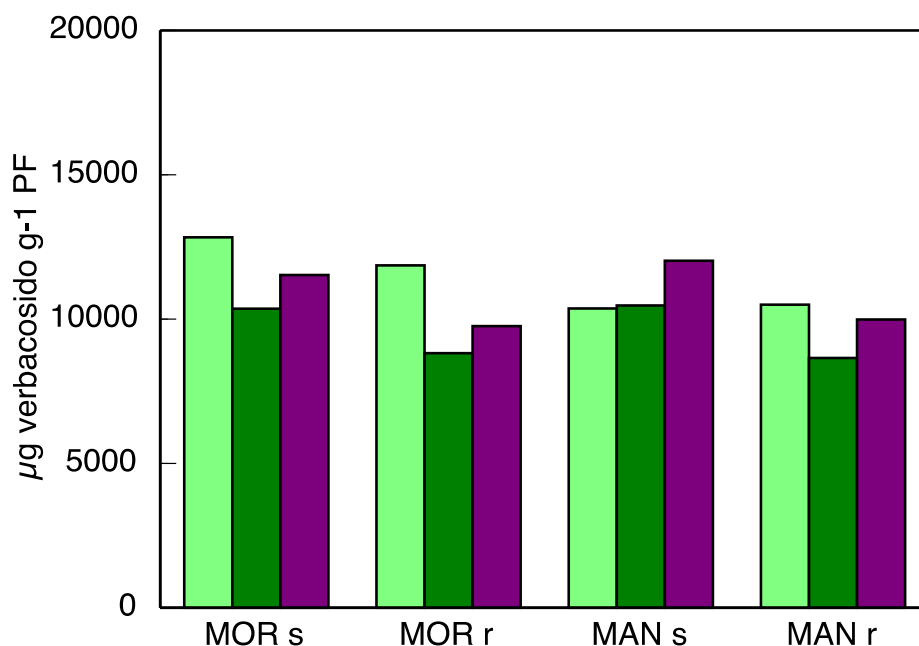


Figura 40. Contenido de PPGs en aceitunas de las variedades Morisca y Manzanilla de Sevilla en los tres estados de maduración estudiados (E1-■-, E2 -■- y E3 -■-), en seco (s) y regadío (r). Los datos son medias de los tres años medidos.

En la figura 41 se muestra la **actividad PPO** obtenida en aceitunas Morisca y Manzanilla, en diferentes estados de maduración, cultivadas en seco y regadío y durante los tres años estudiados. Lo más evidente que se aprecia es que el año 2011 es claramente diferente a los otros dos, obteniéndose valores de actividad PPO, en general, mucho mayores. Así, en este año 2011 (figura 41A), en lo que se refiere a la variedad Morisca cultivada en condiciones de seco, se obtiene la mayor actividad PPO en las aceitunas menos maduras, sufriendo luego en los estados E2 y E3 una fuerte disminución, mostrando E3 una actividad ligeramente superior a E2 (379,40 y 298,87 U PPO mg⁻¹ prot para E3 y E2, respectivamente). En condiciones de regadío la actividad PPO disminuye gradualmente con el estado de madurez (1.026,49; 718,36 y 336,32 U PPO mg⁻¹ prot para E1, E2 y E3, respectivamente). En la variedad Manzanilla no se encuentran valores tan altos de actividad PPO como los mostrados por Morisca en el estado E1, aunque también la mayor actividad se encuentra en el estado E1; en condiciones de seco esta actividad va disminuyendo gradualmente con la maduración y en regadío prácticamente no hay diferencias entre el estado E2 y E3.

En el año 2012 (figura 41B) la variedad Morisca en condiciones de seco muestra menor actividad PPO conforme aumenta el estado de maduración aunque

con poca significación, solamente se puede apreciar una diferencia significativa entre E1 y E3 (479,51; 424,59 y 368,04 U PPO mg^{-1} prot para E1, E2 y E3, respectivamente). En condiciones de regadío, prácticamente no hay variación de la actividad PPO con el estado de maduración; este mismo resultado lo muestran las aceitunas de la variedad Manzanilla en condiciones de secano. Con respecto a las de regadío, solamente destacar que, este caso, E3 presenta una actividad significativamente superior a las mostradas por E1 y E2 (341,26; 276,42 y 475,52 U PPO mg^{-1} prot para E1, E2 y E3, respectivamente).

En el año 2013 (figura 41C), la variedad Morisca en tanto en secano como en regadío muestran resultados semejantes: la mayor actividad la muestran las aceitunas en el estado E1, en E2 hay una disminución y el E3 se recupera ligeramente dicha actividad (455,35; 280,17 y 354,65 U PPO mg^{-1} prot para E1, E2 y E3, respectivamente en secano y 424,10; 250,55 y 306,08 U PPO mg^{-1} prot para E1, E2 y E3, respectivamente en regadío). En la variedad Manzanilla también se obtiene resultado similar en ambas condiciones de cultivo: La actividad PPO baja en el estado E2 con respecto a E1, aunque con poca o ninguna significación, pero en esta variedad en el estado E3 hay un ligero aumento de la actividad (249,00; 215,21 y 313,82 U PPO mg^{-1} prot para E1, E2 y E3, respectivamente en secano y 258,01; 182,73 y 323,99 U PPO mg^{-1} prot para E1, E2 y E3, respectivamente en regadío).

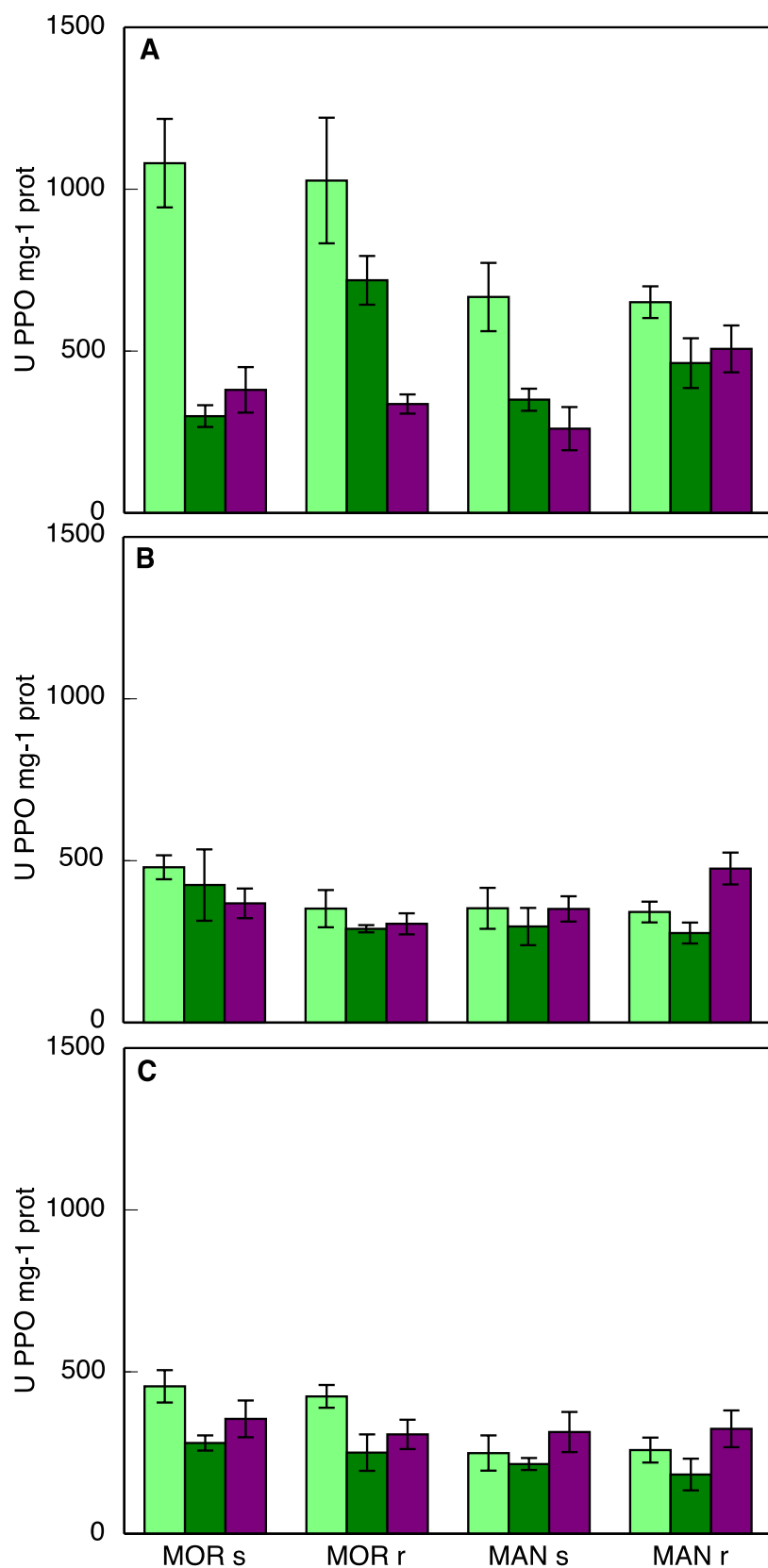


Figura 41. Actividad PPO en aceitunas de las variedades Morisca y Manzanilla de Sevilla en los tres estados de maduración estudiados (E1-■-, E2 -■- y E3 -■-), en seco (s) y regadío (r), durante los 2011 (A), 2012 (B) y 2013 (C). Los datos son medias±SD de, al menos, 5 repeticiones independientes, realizadas por triplicado.

Realizando la media de todos los años estudiados (figura 42), se obtiene que a la actividad PPO no le afecta, prácticamente, las condiciones de cultivo, la variedad sí parece afectar, Morisca tiene, en general, más actividad, sobre todo en las aceitunas menos maduras. El estado de maduración afecta más a Morisca donde claramente se aprecia que hay más actividad en E1, este resultado también lo muestra Manzanilla en seco, pero no en regadío, donde en el estado más maduro hay una subida de la actividad PPO.

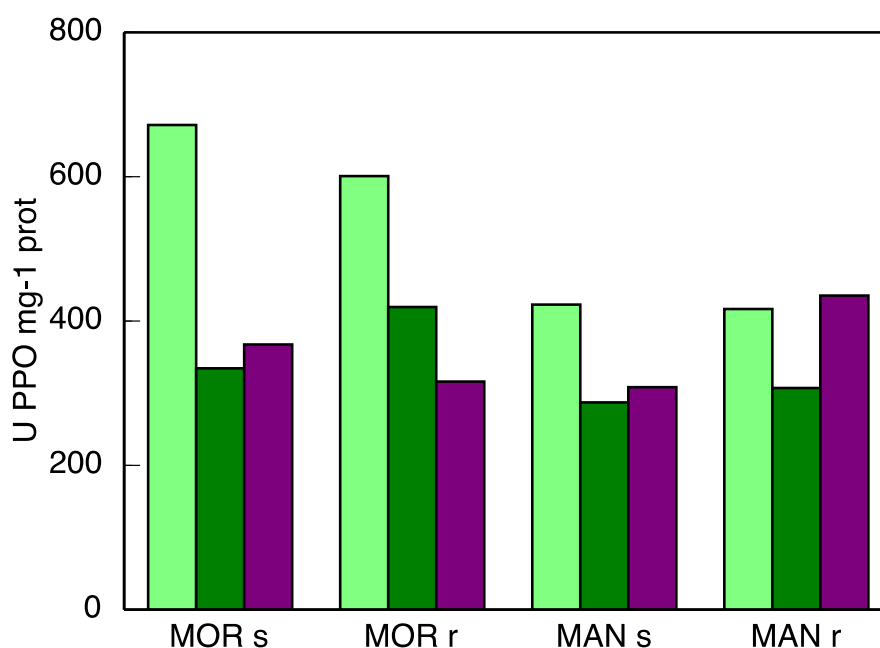


Figura 42. Actividad PPO en aceitunas de las variedades Morisca y Manzanilla de Sevilla en los tres estados de maduración estudiados (E1-■-, E2 -■- y E3 -■-), en seco (s) y regadío (r). Los datos son medias de los tres años medidos.

De acuerdo con los resultados obtenidos en este apartado, se puede concluir que el **contenido total de fenoles, flavonoides y PPGs** muestra un comportamiento similar (figuras 35, 37 y 39). En 2011 los resultados obtenidos muestran valores totales significativamente diferentes a los obtenidos en los años 2012 y 2013 (similares entre sí). Estas fluctuaciones dependientes del año han sido también descritas en las variedades Cheniali y Arbosana (Sofo et al., 2018). En 2011 no se observan diferencias en ninguno de los compuestos estudiados como consecuencia de la variedad de olivo ni tampoco por las condiciones de cultivo de seco o regadío. Sólo el estado de

maduración de las aceitunas muestra diferencias. Todos los tipos de compuestos fenólicos determinados se incrementan con el progreso de la maduración, obteniéndose los valores más altos en el estado maduro (E3). Sin embargo, en 2012 y 2013 los contenidos de estos compuestos son muy superiores a los de 2011. Los fenoles totales muestran un comportamiento similar al observado en 2011, independientemente de la variedad y riego, y dependientes únicamente del estado de maduración. Flavonoides y PPGs muestran cómo la variedad, el aporte hídrico y el estado de maduración influyen en su contenido total. La variedad Morisca presenta mayor cantidad de flavonoides y PPGs que la Manzanilla, y a su vez, en ambas variedades el secano induce un mayor contenido de estos compuestos. La variedad Manzanilla tiene niveles más similares a 2011 que la Morisca. En cuanto al grado de maduración, los valores fluctúan en 2012 en los diferentes tratamientos, mientras que en 2013 la tendencia es a disminuir con la maduración al igual que describe Cerretani et al. (2004). Sin embargo, la tendencia general que muestran ambas variedades es a disminuir con la maduración hasta el estado E2, con un posterior incremento en E3. El contenido y evolución de estos compuestos depende en gran medida de la variedad estudiada. Así, Ortega-García et al. (2008) describen cómo en la variedad Picual en secano se producen leves fluctuaciones en el contenido fenólico total a medida que se produce la maduración; pero, Ortega-García y Peragón (2009) en las variedades Picual, Verdial, Arbequina y Frantoio describen descensos de los niveles de compuestos fenólicos con la maduración, coincidente con los resultados de Morelló et al. (2005) en las variedades Arbequina, Farga y Morrut. Sin embargo, en este último trabajo también se describe cómo el contenido total en flavonoides muestra fluctuaciones con la maduración, con tendencia a la disminución pero con grandes diferencias en cuanto al contenido total y a las fluctuaciones que se observan. Por último, Sobhy El Sohaimy et al. (2016) en las variedades Manzanilla y Kalamata describen descensos tanto en los fenoles totales como en los flavonoides con la maduración, si bien son descensos muy leves. Estos resultados en conjunto muestran la gran variabilidad dependiente tanto del estado de maduración como de la variedad y, sobre todo, de las condiciones concretas que se han dado en el año de estudio ya que este factor puede contribuir al desarrollo de respuestas a estreses, proceso en el que este tipo de compuestos está implicado al eliminar H_2O_2 y actuar como agentes detoxificadores.

En cuanto a la **actividad PPO** (figura 41), que junto con la actividad POD parecen ser claves en el proceso de maduración de las aceitunas, no se observan diferencias por el aporte o no de riego, pero sí manifiesta una clara influencia del año de estudio. Así, en 2011 los niveles de actividad PPO son muy superiores a los obtenidos en 2012 y 2013, similares entre sí. En todos los casos la variedad Morisca presenta mayor actividad PPO, sobre todo en 2011. La evolución de la PPO con la maduración es también diferente según las variedades. En Morisca la PPO disminuye desde el inicio de la maduración hasta su finalización, E3, resultado que coincide con el descrito en las variedades Gordal y Picual (Hornero-Méndez et al., 2002). En la variedad Manzanilla la PPO sólo disminuye con la maduración en 2011, donde los niveles de actividad son muy altos. En el resto de años estudiados, la PPO muestra valores similares a lo largo de la maduración con un ligero incremento final. Este desigual comportamiento dependiendo de la variedad es también observado en las variedades Picual, con aumento inicial y posterior descenso en maduración, y Arbequina con fluctuaciones que mantiene los niveles de actividad PPO prácticamente constantes (García-Rodríguez et al., 2011). Hbaieb et al. (2015, 2016) describen fluctuaciones (variedad Chétoui) o descensos (variedad Arbequina) con la maduración. Nuevamente, los resultados obtenidos dependen en gran parte de la variedad utilizada y posiblemente también de las condiciones ambientales concretas del estudio. En este aspecto, se destaca que en este trabajo se ha estudiado el comportamiento de la PPO en 3 años consecutivos, mientras que en el resto de trabajos consultados los datos de actividad PPO se refieren a un único año, donde las condiciones pueden ser muy diferentes y eso puede explicar los diferentes resultados. Así, Ortega-García et al. (2008) y Ortega-García y Peragón (2009) observan un incremento de esta actividad con la maduración en Picual y Verdial, pero en Arbequina y Frantoio describen fluctuaciones que mantienen más constante esta actividad, incluso con incrementos en el estado más maduro. En contraposición a estos resultados, Ebrahimzadeh et al. (2003) describen aumentos de actividad PPO con la maduración en la variedad Zard, al igual que Cirilli et al. (2017) en Frantoio, con valores finales más altos en condiciones de regadío. En el caso de este trabajo, la diferente actividad PPO observada coincide con la evolución y cantidad de los compuestos fenólicos determinados en los diferentes tratamientos, sobre todo en

2011. Esta actividad se ve influenciada tanto por la variedad, estado de maduración y año, mientras que las condiciones de regadío tienen poca influencia.

Además de las actividades SOD y POD, la PPO también está implicada en el mantenimiento del equilibrio redox y la respuesta frente a estreses ambientales. Además, la PPO interviene junto a las POD en la oxidación y modificación del perfil fenólico durante la maduración de las aceitunas, especialmente, como ya se ha comentado con anterioridad, produciendo la oxidación de glucósidos fenólicos (García-Rodríguez et al., 2011). Por tanto, estas dos actividades modulan conjuntamente la maduración y las características fenólicas finales de las aceitunas, lo que tienen una gran importancia para la posterior calidad de los aceites obtenidos a partir de ellas. La actividad PPO está fuertemente influenciada por la maduración y el genotipo, así la variedad MOR tiene mayor actividad PPO que la Manzanilla, lo que concuerda con el resultado anteriormente comentado de la POD para estas variedades. Las actividades POD y PPO están muy relacionadas entre sí, dependiendo en gran medida del estado de la maduración, aunque la actividad PPO no se muestra influenciada por las condiciones de cultivo lo que podría indicar una mayor relación de la PPO con la maduración y no con la respuesta a estreses ambientales, mientras que la POD estaría más directamente implicada en ambos procesos.

6. Capacidad Antioxidante (FRAP)

Se ha determinado la capacidad antioxidante o poder reductor total, medidos mediante el ensayo FRAP, en aceitunas de las variedades Morisca y Manzanilla en los diferentes años, estados de maduración y condiciones de cultivo estudiadas, en la figura 43 se muestran los resultados.

Los valores de capacidad antioxidante obtenidos en el año 2011 son muy inferiores a los obtenidos en los dos años posteriores, 2012 y 2013. Los resultados de este año 2011 (figura 43A) son similares en ambas variedades y en ambas condiciones de cultivo, en todos estos casos se aprecia cómo esta capacidad antioxidante aumenta con el estado de maduración, en E1 los valores oscilan entre 21, 54 y 22,03 $\mu\text{g SO}_4\text{Fe g}^{-1}$

¹ PF, en E2 entre 26,57 y 26,76 $\mu\text{g SO}_4\text{Fe g}^{-1}$ PF y en E3 entre 27,76 y 28,02 $\mu\text{g SO}_4\text{Fe g}^{-1}$ PF.

En el año 2012 (figura 43B) los datos ofrecen resultados completamente diferentes al año anterior. En primer lugar, los valores aumentan hasta cuadruplicar los obtenidos en la campaña 2011. La variedad Morisca, tanto en condiciones de secano como en regadío, no muestra diferencias significativas entre E1 y E2, pero en E3 se aprecia un aumento de esta capacidad antioxidante. Por otro lado, la variedad Manzanilla en condiciones de secano no presenta variación significativa de la capacidad antioxidante entre los distintos estados de maduración. Esta variedad en regadío presenta el mismo perfil descrito para Morisca, con poca variación de esta capacidad antioxidante entre E1 y E2, con un posterior aumento en E3.

En 2013 (figura 43C), los valores de capacidad antioxidante son también elevados con respecto a los del año 2011. La variedad Morisca en condiciones de secano no presenta diferencias entre los estados de maduración, pero en condiciones de regadío se encuentran los valores mayores en el estado E1 y los menores en el E2, con valores intermedios en E3. En cuanto a la variedad Manzanilla, en secano se aprecia un aumento de la capacidad antioxidante con el estado de maduración, sin embargo en el regadío el perfil obtenido es el mismo que para la variedad Morisca en las mismas condiciones de regadío. Este año 2013, se aprecia que la actividad antioxidante es mayor en las condiciones de secano que en las de regadío con excepción del estado E1 de la variedad Manzanilla.

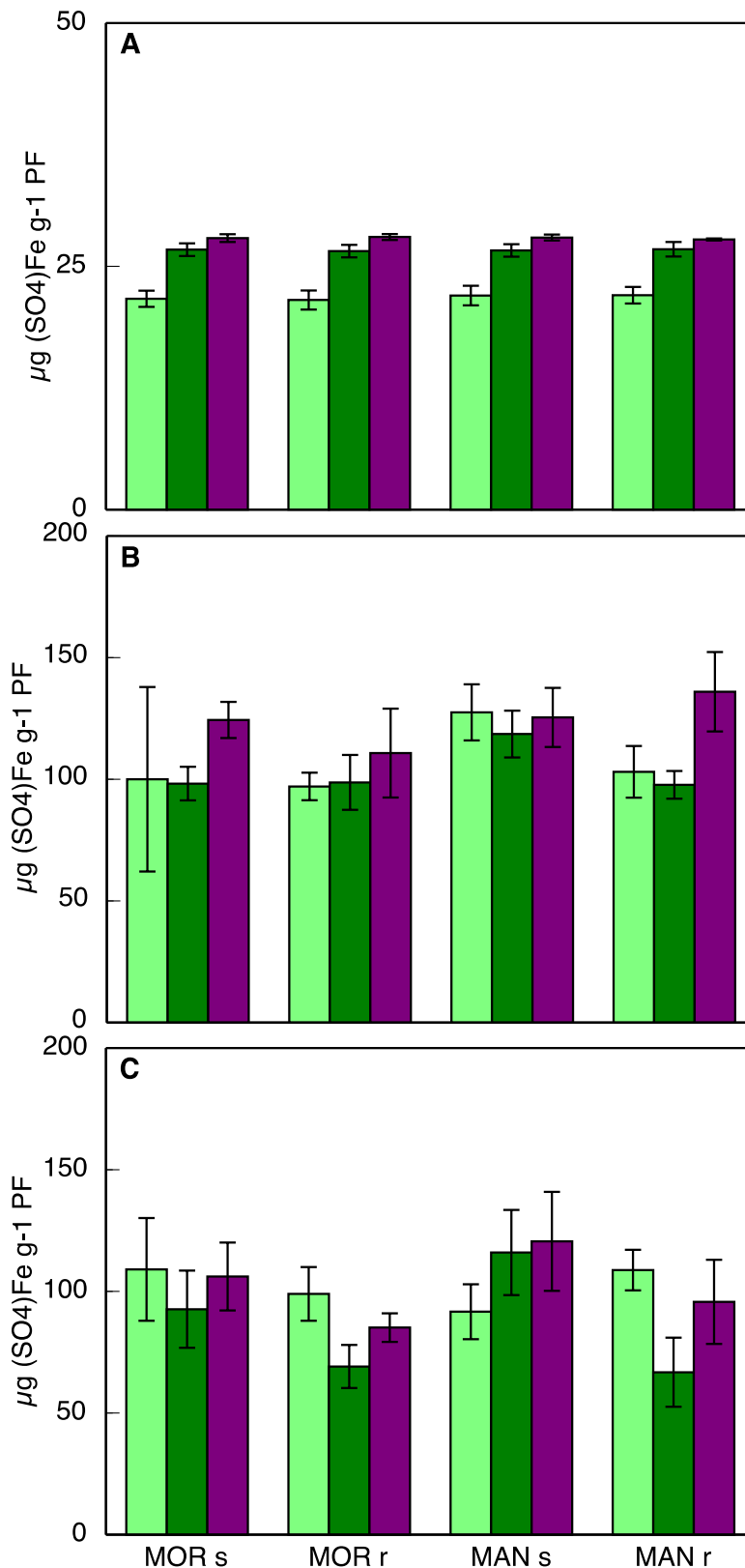


Figura 43. Capacidad antioxidante total (ensayo FRAP) en aceitunas de las variedades Morisca y Manzanilla de Sevilla en los tres estados de maduración estudiados (E1-■-, E2 -■- y E3 -■-), en seco (s) y regadío (r), durante los años 2011 (A), 2012 (B) y 2013 (C). Los datos son medias \pm SD de, al menos, 5 repeticiones independientes, realizadas por triplicado.

Al realizar las medias con todos los años estudiados (figura 44), se observa que la capacidad antioxidante varía con el estado de maduración y, excepto la variedad Manzanilla en condiciones de secano, las demás siguen la misma pauta: menor capacidad antioxidante en el estado E2 y entre E1 y E3 poca diferencia. En la variedad Manzanilla en secano esta capacidad aumenta con el estado de maduración. En esta misma figura puede observarse también cómo la capacidad antioxidante es mayor en condiciones de secano que en regadío.

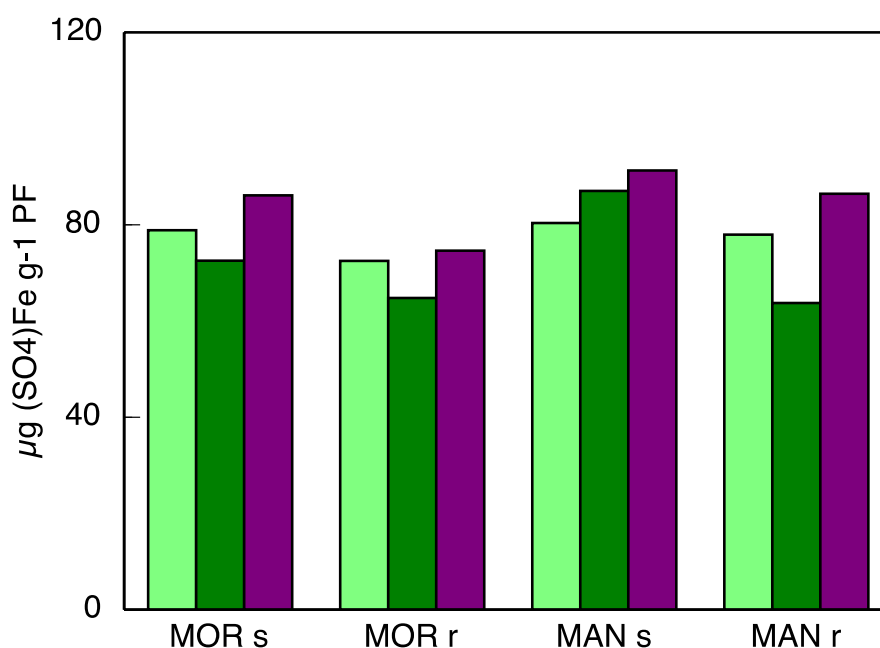


Figura 44. Capacidad antioxidante total en aceitunas de las variedades Morisca y Manzanilla de Sevilla en los tres estados de maduración estudiados (E1-■-, E2 -■- y E3 -■-), en secano (s) y regadío (r). Los datos son medias de los tres años medidos.

Según estos resultados, se puede concluir que la capacidad antioxidante total es menor en 2011 que en el resto de años estudiado. Sin embargo, el comportamiento no se ve influenciado ni por la variedad ni las condiciones de cultivo. Permaneciendo los valores muy similares en todos los caso dentro de un mismo año. El contenido fenólico podría ser el que determinara la capacidad antioxidante total. En *Cicer arietinum* la capacidad antioxidante total parece estar determinada por la cantidad de isoflavonas que se acumulan (Guardado-Félix et al., 2017). En 2011 donde los niveles de compuestos fenólicos totales, flavonoides y PPGs son muy inferiores a los del resto de años estudiados (figuras 35, 37 y 39), la capacidad antioxidante es también menor

(aproximadamente 1/4). En cuanto al efecto del índice de maduración, sólo se observa una leve tendencia a tener una mayor capacidad antioxidante en el estado maduro, E3, dato que coincide parcialmente con el descrito por Arslan y Özcan (2011); estos autores describen fluctuaciones de esta capacidad muy fuertes entre años consecutivos y también dependientes del estado de maduración, e incluso de la localización del ensayo ya que han estudiado una única variedad pero en 4 localizaciones muy diferentes, es decir, influyen en este caso otros condicionantes ambientales derivados de la localización de los diferentes cultivos muestreados. Sobhy El Sohaimy et al. (2016) en las variedades Manzanilla y Kalamata observan un descenso de la capacidad antioxidante total desde los primeros estadios de maduración hasta la finalización de este proceso, si bien sus resultados no son del todo comparables a los aquí mostrados al tratarse de datos procedentes de una única campaña, lo que nos podría inducir a comparaciones erróneas.

7.- Análisis global del efecto de los factores productivos en la respuesta del olivo mediante MDS-PTA

7.1.- Comparación entre Métodos

En primer lugar se ha realizado una comparación entre el análisis PTA y la variante que se propone en el presente trabajo (MDS-PTA). El objetivo de esta comparación es verificar la validez de la hipótesis que se ha planteado inicialmente, es decir, comprobar si las situaciones de estudio son similares, sin que se observe la formación de grupos en un diagrama de dispersión, donde los vectores que representan cada situación en la etapa de análisis de la inter-estructura en un PTA muestran un ángulo con valores bajos, y por tanto, se puede “colapsar” una situación sobre otra sin perder información. En este caso, ese diagrama de dispersión es obtenido por un análisis MDS y es conocido como *espacio común*.

El análisis MDS dio un porcentaje de varianza explicado del 98,33% y un valor de estrés del 1,97%, que según el criterio de Kruskal supone un ajuste casi perfecto.

En la figura 45 pueden observarse los resultados de esta comparación para los dos factores con los que se podrían haber construido una estructura cúbica basada en una evolución temporal: el año (figura 45A) y el grado de madurez (figura 45C). Aunque todos los análisis se realizaron con el programa SPSS, para obtener los vectores que se muestran en las figuras 45B y 45D se utilizó el programa ADE4, diseñado para el análisis de tablas de tres vías.

Como puede observarse en las figura 45A y 45C, es precisamente en el primero de los casos donde no se observan grupos diferenciados de individuos correspondientes a cada año, sino que están entremezclados, coincidiendo con la figura 45B en la que se solapan dos vectores (los correspondientes a los años 2012 y 2013), así mismo, el ángulo que conforman con el año 2011 no es elevado.

Sin embargo, si se considera el estado de madurez, figura 45C, sí se aprecia la formación de subgrupos que se corresponden con los distintos estados de maduración de las aceitunas (E1, E2 y E3) y, coincidiendo con el resultado del análisis inter-estructura (figura 45D) en el que los distintos vectores correspondientes a cada estado de maduración no están ni próximos ni superpuestos.

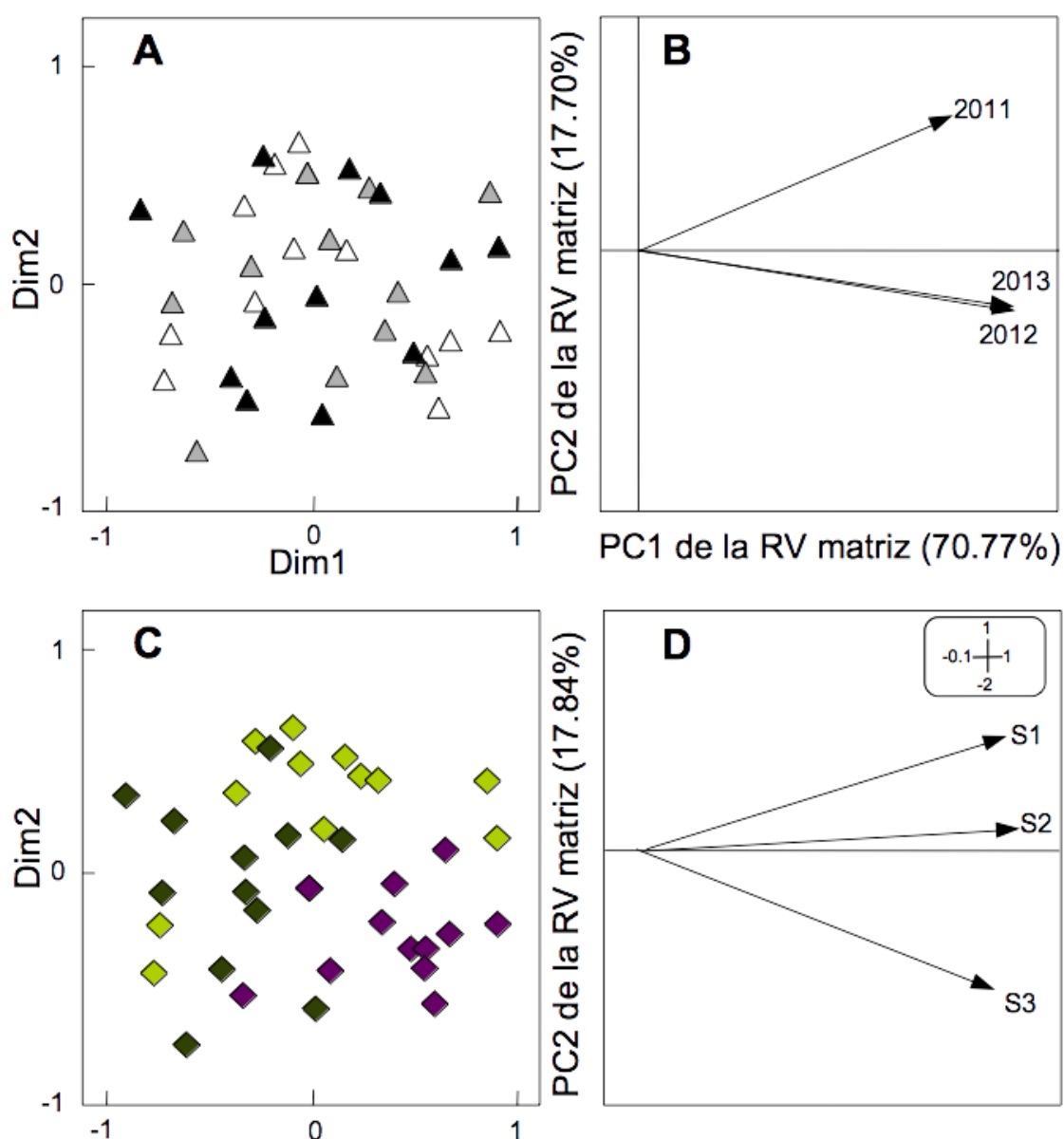


Figura 45. Plots del espacio común MDS (**A** y **C**, para los 3 años: \triangle 2011, \triangle 2012 y \blacktriangle 2013-, y estados de maduración: \blacklozenge E1, \blacklozenge E2 y \blacklozenge E3, respectivamente) y similaridad expresada como coeficientes de análisis RV (**B** y **D**, para los 3 años y estados de maduración, respectivamente).

Además de este análisis en el que se evalúa la idoneidad de la hipótesis planteada, se hizo una comparación con el método CA-PTA (Gourdol et al., 2013; Darwiche-Criado et al., 2015) (figura 46). Inicialmente se realizó la determinación del número de clúster mediante un análisis del coeficiente de aglomeración. A partir de este análisis puede observarse cómo los individuos, identificados por el año o el estado de maduración, forman 3 grupos o clústeres principales. Con posterioridad, se realizó

un análisis clúster jerárquico en el que se identificaron los casos en función del año y del estado de madurez. Si se analiza por año, no se observa una agrupación de individuos según se hayan muestreado en el 2011, 2012 o 2013; al aparecer dentro de cada clúster individuos de años distintos. Esto sugiere que la causa de diferencia entre individuos es distinta al año. Por el contrario, si se analiza por estado de madurez, si se observa una mayor tendencia a la formación de grupos o clústers homogéneos, especialmente en el clúster intermedio donde quedan recogido la mayoría de los individuos S2 (salvo dos excepciones con S1) y en el clúster inferior formado mayoritariamente por individuos S3 (aunque hay dos individuos S1 en este grupo). En el clúster superior aparecen individuos de todos los estados de madurez.

En la figura 46 y en la Tabla 8, se puede ver cómo las proteínas totales, los flavonoides, la oxidación de NADH y la actividad POX varían significativamente entre los grupos. Sin embargo, al considerar la agrupación por año y por la etapa de madurez, solo observamos una separación pobre de individuos entre agrupaciones, a diferencia del caso MDS (figura 45).

Este resultado muestra una baja agrupación de individuos (por año o estado de madurez) en los clusters, contrario al resultado obtenido usando la metodología MDS. Esto es debido a que en el análisis clúster se aplica el método de Ward, basado en buscar la máxima homogeneidad intragrupo, usando la suma de cuadrados de los errores para determinar dicha homogeneidad. Sin embargo, el MDS se basa en la similitud entre individuos usando el concepto de distancia para medir dicha similitud o parecido.

Por todo ello, el método propuesto de MDS-PTA parecería ser una alternativa razonable a considerar en casos similares, donde se observa un bajo poder de agrupación.

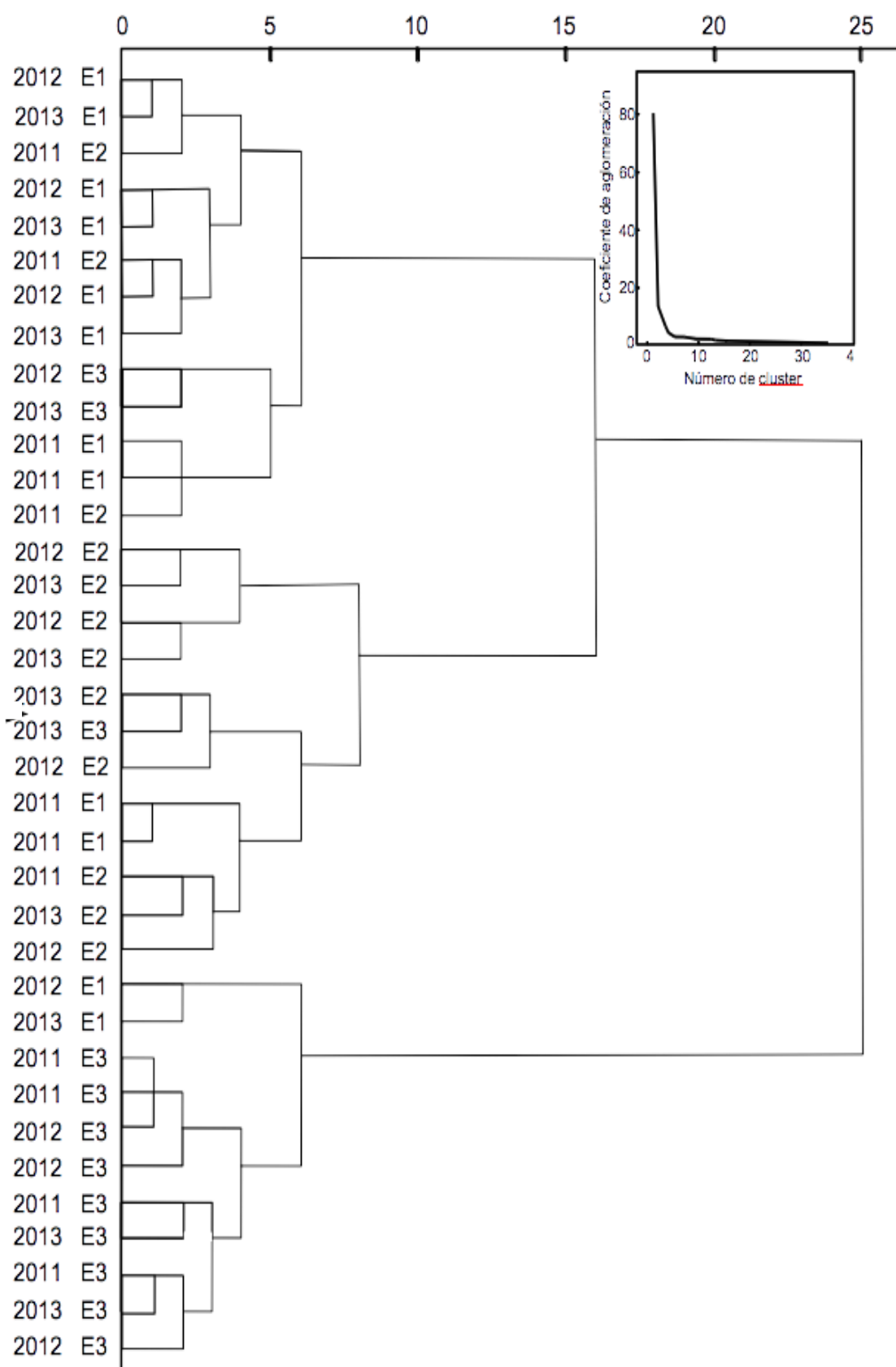


Figura 46. Esquema de aglomeración y dendrograma en función del año y estado de maduración generados por el método de agrupamiento aglomerativo jerárquico de Ward. Inserta la representación del coeficiente de aglomeración.

Tabla 8. Valores medios y desviación standard de los tres clusters.

Parámetro	Clúster 1	Clúster 2	Clúster 3
PS/PF	0.29±0.02	0.33±0.03	0.30±0.04
Aminoácidos solubles	2277.07±1063.93	4227.54±2025.97	2256.96±944.96
Proteínas totales	1.27±0.56 ^b	2.52±0.77 ^a	1.51±0.63 ^{ab}
Fenoles totales	2796.89±879.88	3327.85±904.56	2487.95±566.3
Flavonoides totales	6144.22±1518.23 ^b	8102.41±1126.46 ^a	5745.00±945.34 ^b
PPGs	10097.94±2657.05	12305±2518.37	9901.03±1971.65
Oxidación NADH	553.87±278.13 ^b	541.82±249.2 ^b	1095.51±373.3 ^a
Producción O ₂ ⁻	250.92±98.07	279.07±129.8	445.73±215.83
SOD	92.56±50.25	100.36±55.15	146.53±46.69
POX	92.78±35.69 ^b	71.83±29.03 ^b	173.45±45.59 ^a
PPO	467.73±168.25	402.28±55.12	334.64±126.81
FRAP	75.7±43.85	87.15±47.77	76.69±37.41

Aminoácidos y proteínas totales expresadas como mg g⁻¹ PF; Oxidación NADH, Producción O₂⁻ y actividad POX expresadas como nmoles min⁻¹ mg⁻¹ proteína; actividades SOD y PPO expresadas como U mg⁻¹ proteína; fenoles, flavonoides y PPGs total y FRAP expresados como µg g⁻¹ PF.

Letras diferentes indican diferencias significativas.

7.2.- Individuos Compromiso

En la tabla 6 podían observar los datos originales para los diferentes variables que se han considerados (año, variedad, aporte o no de riego y estado de madurez). Realizar un análisis estadístico de la misma para conocer las diferencias significativas que puedan haber, considerando los efectos individuales de cada factor y sus interacciones, es de enorme complejidad, máxime si se considera que los datos se obtienen no de un ensayo totalmente controlado en laboratorio sino que, por el contrario, son obtenidos a partir de material cultivado en campo y en producción, lo que incide en una mayor variabilidad de todos los factores que pueden incidir sobre ellos.

Sin embargo, gracias a los resultados obtenidos en la comparación entre métodos (apartado 7.1), se puede simplificar el análisis de los datos al tener sólo tres

factores (figura 47): 1º estado de maduración, 2º variedad y, 3º aporte o no de riego. Puede generarse una nueva figura que captura el 70,9% de la variabilidad en las dos primeras componentes principales, obtenida a partir de la matriz de compromiso, y que recoge a los individuos consenso o de características medias, teniendo en cuenta que el año es un factor sobre el que se ha colapsado al comprobarse que los individuos de cada año eran muy similares (en la figura 45A no se observaba la existencia de grupos como sí pasaba en la Figura 45C).

Las características de estos nuevos individuos compromisos se recogen en la tabla 9, en la que además se muestran las diferencias significativas para cada uno de los factores que se han considerado.

En la tabla 10 se muestra los valores medios globales para las diferentes variables, así como las diferencias significativas según el efecto de los factores de forma individual y sus interacciones, tal y como proponen Hernández et al. (2015) para la identificación de compuestos fitoquímicos.

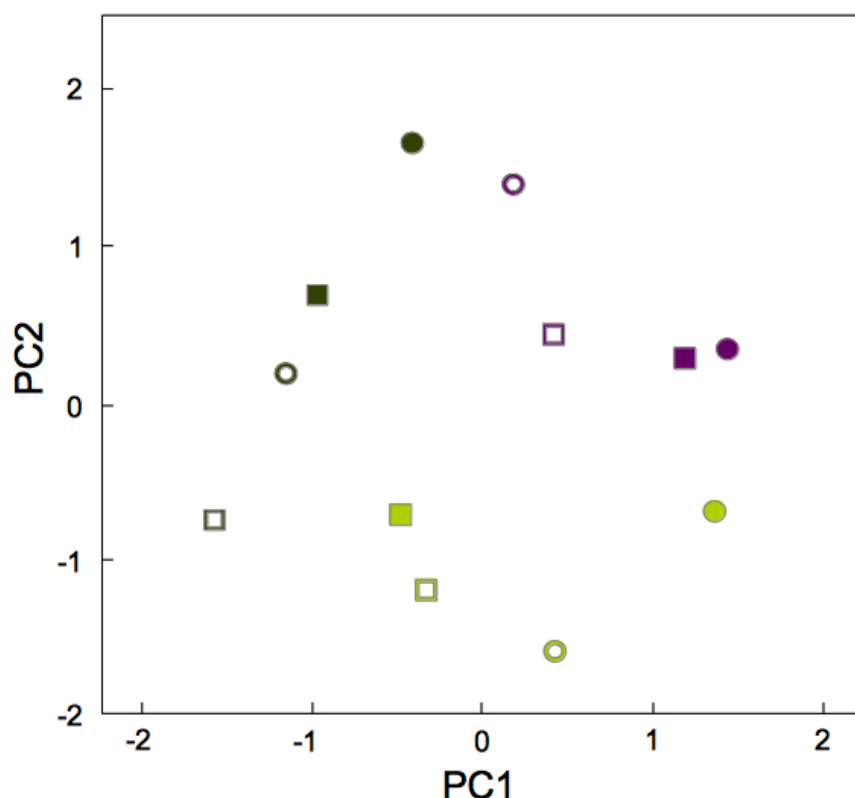


Figura 47. Matriz de compromiso de las dos primeras coordenadas factoriales. Manzanilla seco -■- y regadío -□-, Morisca seco -●- y regadío -○-. Los estados de maduración **E1**, **E2** y **E3** como en la figura 56.

Tabla 9. Características de los nuevos individuos compromisos, indicando las diferencias significativas para cada uno de los factores que se han considerado.

		PS/PF	Aminoácidos	Proteínas	Oxidación NADH	Producción O ₂ -	SOD	POD	Fenoles	Flavonoides	PPGs	PPO	FRAP
Estado madurez: E1													
Morisca	sin riego	0,31±0,06	3058,59±1512,59	1,42±0,45	469,9±54,28	261,46±41,7	51,8±9,55	65,5±23,81	3170,54±1270,9	7568,16±3191,77	12828,93±5238,02	560,78±148,49	79,73±50,74
	con riego	0,29±0,02	1986,15±411,69	1,31±0,28	374,48±96,63	221,01±90,46	47,29±6,54	65,96±18,81	2842,11±975,89	6341,94±1871,82	10882,44±3472,08	495,18±130,02	75,51±48,69
Manzanilla	sin riego	0,33±0,02	1612,79±369,18	0,73±0,15	705,62±363,62	325,75±86,49	122,36±15,93	144,67±61,85	2675,76±809,38	6013,86±1762,32	10457,01±2959,98	392,8±196,91	76,6±51,02
	con riego	0,29±0,04	2068,86±677,91	0,64±0,11	565,76±343,13	263,2±38,69	138,91±22,02	111,94±61,44	2703,46±855,69	6213,59±1370,84	10857,85±2844,56	352,48±125,28	81,41±51,63
Estado madurez: E2													
Morisca	sin riego	0,31±0,02	2942,94±1024,65	2,13±0,07	1293,25±794,8	547,29±444,48	102,11±38,59	151,75±96,68	2782,1±712,52	6169,55±1816,15	11554,22±2412,09	431,42±154,78	70,57±38,15
	con riego	0,28±0,02	2940,52±1178,86	1,88±0,63	802,64±316,23	344,48±266,04	81,66±29,01	169,36±74,99	2219,47±569,35	5220,94±419,91	8359,42±2340,53	423,13±265,77	63,56±36,18
Manzanilla	sin riego	0,31±0,03	1413,96±345,06	1,18±0,27	991,93±304,08	407,03±86,27	166,62±85,08	163,06±22,87	2265,34±478,36	6024,09±292,12	10058,55±2001,15	297,16±82,23	92,8±58,27
	con riego	0,26±0,03	1856,09±1185,28	1,25±0,05	791,11±147,56	299,37±90,96	134,23±69,99	141,9±25,08	2365,73±389,14	5287,97±480,19	8774,14±1227,44	303,57±171,48	63,69±35,63
Estado madurez: E3													
Morisca	sin riego	0,34±0,02	4537,28±2139,93	2,63±0,72	503,84±364,77	282,9±163,59	93,76±45,58	67,17±52,01	3403,66±1101,58	8074,13±1423,18	11867,21±2262,37	382,04±11,98	91,25±55,09
	con riego	0,31±0,05	5270,87±2148,57	2,76±0,9	822,47±354,55	406,59±115,91	108,33±47,5	109,57±25,74	3160,18±947,73	7275,65±965,06	10469,21±937,65	355,62±29,29	76,1±44,27
Manzanilla	sin riego	0,32±0,04	3758,51±2432,84	2,39±0,84	616,64±360,02	222,62±153,33	151,59±75,3	71,54±21,76	3341,92±1000,38	7920,24±1121,47	12320,19±2636,01	380,24±47,03	98,65±61,39
	con riego	0,31±0,04	2949,6±1210,25	2,44±0,55	831,19±440,00	311,78±154,27	156,54±42,46	96,85±48,27	3343,52±1117,67	7203,67±999,52	10051,03±739,64	466,02±55,4	84,49±52,05

Aminoácidos y proteínas totales en mg g⁻¹ PF; oxidación NADH, producción O₂- y actividad POD en nmoles min⁻¹ mg⁻¹ proteína; actividad SOD y PPO en U mg⁻¹ proteína; fenoles, flavonoides, PPGs totales y actividad FRAP en µg g⁻¹ PF.

Tabla 10. Valor medio global y valor de los efectos principales y sus interacciones significativas (las celdas vacías indican que no es significativo el efecto).

Parámetro	Media global	m_i	c_j	r_k	$m_i \cdot c_j$	$m_i \cdot r_k$
PS/PF	0,30±0,02			0,004		
Aminoácidos	2866,35±1188,47	$1,46 \cdot 10^{-5}$	$8,28 \cdot 10^{-5}$			
Proteínas	1,73±0,74	$1,64 \cdot 10^{-9}$	$4,64 \cdot 10^{-6}$			
Oxidación NADH	730,74±252,12	0,039				
Producción $O_2^{\cdot -}$	324,46±92,90					0,01
SOD	112,93±39,34		$3,06 \cdot 10^{-5}$			
POX	113,27±39,98	0,002				
Fenoles	2856,15±428,63	$3,06 \cdot 10^{-5}$				
Flavonoides	6609,48±971,08	0,001				
PPGs	10706,68±1329,36	0,032		0,007		
PPO	403,37±77,18	0,042	0,016		0,009	
FRAP	79,53±10,99	0,002		0,031		

m_i : madurez; c_j : variedad; r_k : riego

Aminoácidos y proteínas totales en mg g^{-1} PF; oxidación NADH, producción $O_2^{\cdot -}$ y actividad POD en $\text{nmol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ proteína; actividad SOD y PPO en U mg^{-1} proteína; fenoles, flavonoides, PPGs totales y actividad FRAP en $\mu\text{g g}^{-1}$ PF.

El resultado del análisis MANOVA mostró que el estado de maduración era el factor que más influía significativamente en la variabilidad de los valores, seguido de la variedad utilizada. Sin embargo, el aporte o no de riego y la interacción entre los tres factores no influían significativamente en los distintos parámetros analizados.

Para conocer qué parámetros son los mejores predictores para discriminar entre los diferentes factores, se aplicó un análisis GLM-AID (Hernández et al., 2015) (figura 48). Según este análisis, la principal diferencia entre las muestras es consecuencia del contenido proteico entre estados de maduración. Jerárquicamente, dentro de cada estado de maduración se puede observar:

- En el estado de maduración E1, las muestras se diferencian únicamente por la actividad PPO que presentan cada una de las variedades, no apreciándose

diferencias debidas a la variedad cuando se aporta riego. Estos datos coinciden con los observados por Ortega-García y Peragón (2009) en cuatro variedades diferentes y donde la variedad Verdial muestra niveles de actividad muy superiores al resto de las estudiadas, siendo Frantoio la que menos actividad PPO muestra. Así mismo, García-Rodríguez et al. (2011) en las variedades Arbequina y Picual muestran cómo en los estados iniciales de maduración hay diferencias entre ambas variedades, con un comportamiento a lo largo de todo el proceso de maduración también diferente.

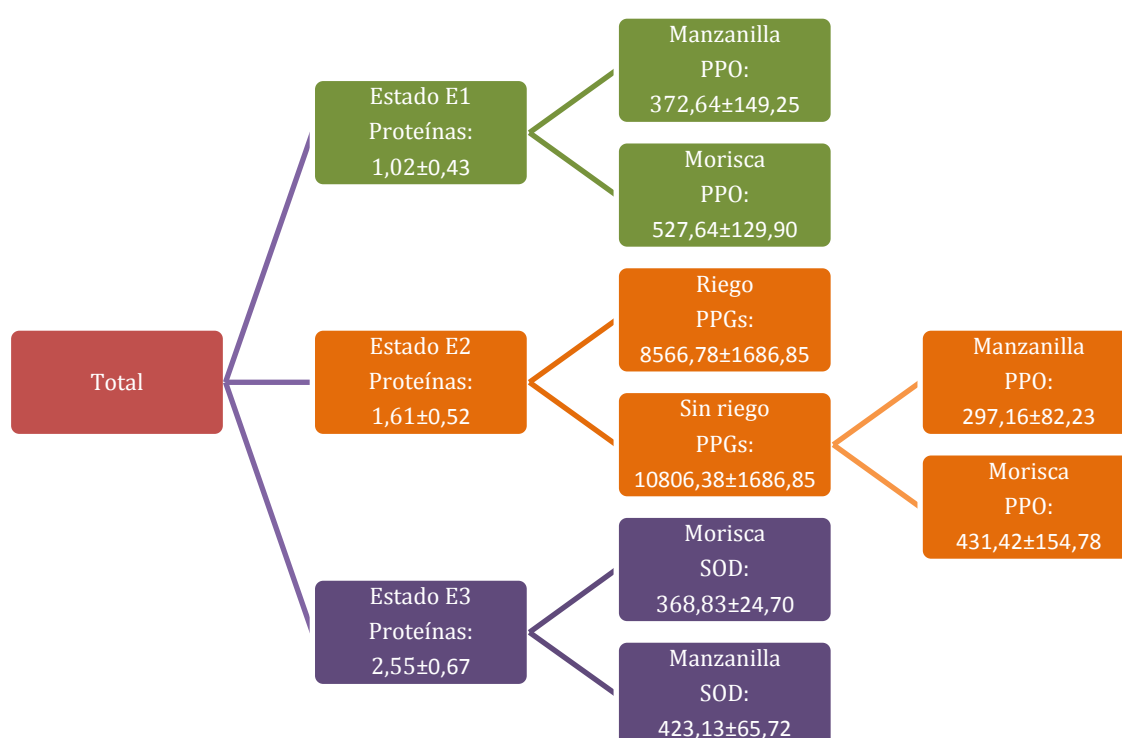


Figura 48. Análisis GLM-AID de los datos obtenidos.

- En el estado de maduración E2, las muestras se diferencian por el contenido en PPGs entre sistemas de riego. En el caso del secano la actividad PPO permite diferenciar entre las dos variedades estudiadas, lo que vuelve a evidenciar la influencia que la variedad tiene en esta actividad, tal y como ha quedado reflejado en anteriores trabajos ya citados.

- En el estado de maduración E3, las muestras se diferencian por la actividad SOD que presenta cada variedad, no apreciándose estas diferencias en el caso del regadío. Esta diferente actividad SOD dependiente de la variedad también es observada por Sofo et al. (2018) en las variedades Chemlali y Arbosanta, en estos casos las actividades se han medido en dos años consecutivos, y se ha observado cómo en el año de gran productividad (año ON) la variedad Arbosanta presenta mayor actividad SOD que Chemlali, por el contrario, en condiciones de baja producción (año OFF) es Chemlali la que presenta una actividad SOD que duplica la de Arbosanta, aunque en ambos casos con valores de actividad muy inferiores a los del año ON. Estos datos evidencian la fuerte influencia de la variedad y del año en esta actividad, todo correlacionado también con la producción.

7.3.- Análisis de las Variables

En la figura 49 se muestra la similitud de los individuos compromiso para cada una de las variables. Cuanto más cercanos estén dos individuos mayor será la similitud entre ellos. El nuevo plano de representación está formado por las dos primeras componentes principales tras el análisis de componentes principales de la matriz compromiso, que captura el 95,10% de la inercia total. En esta figura puede observarse:

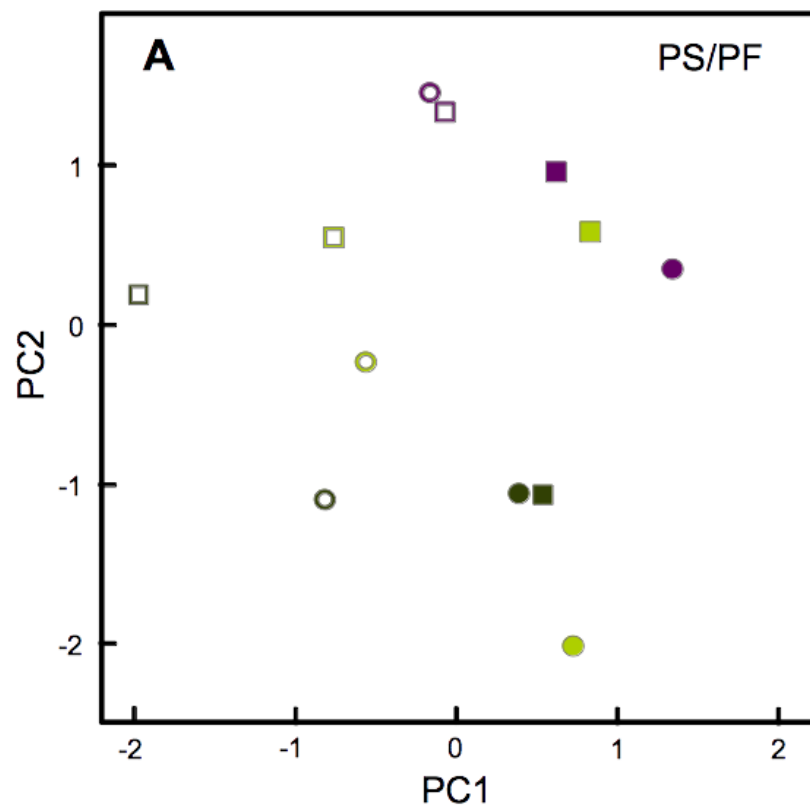
- No se observa efecto del estado de maduración para la relación PS/PF (figura 49A), aminoácidos solubles totales (figura 49B), oxidación de NADH (figura 49D), producción de O_2^- (figura 49E) y actividad PPO (figura 49K).

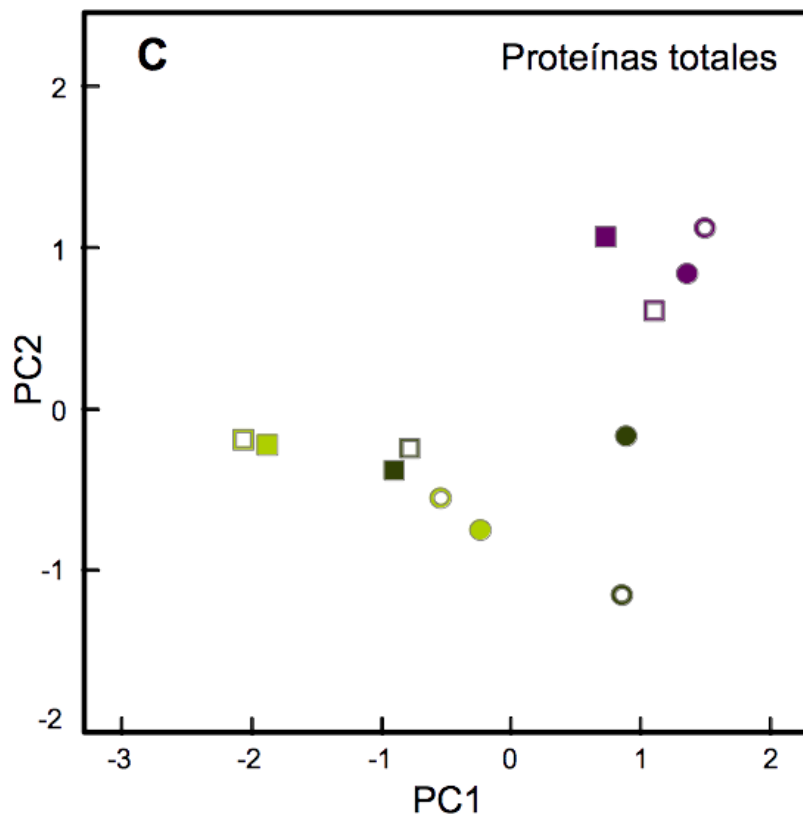
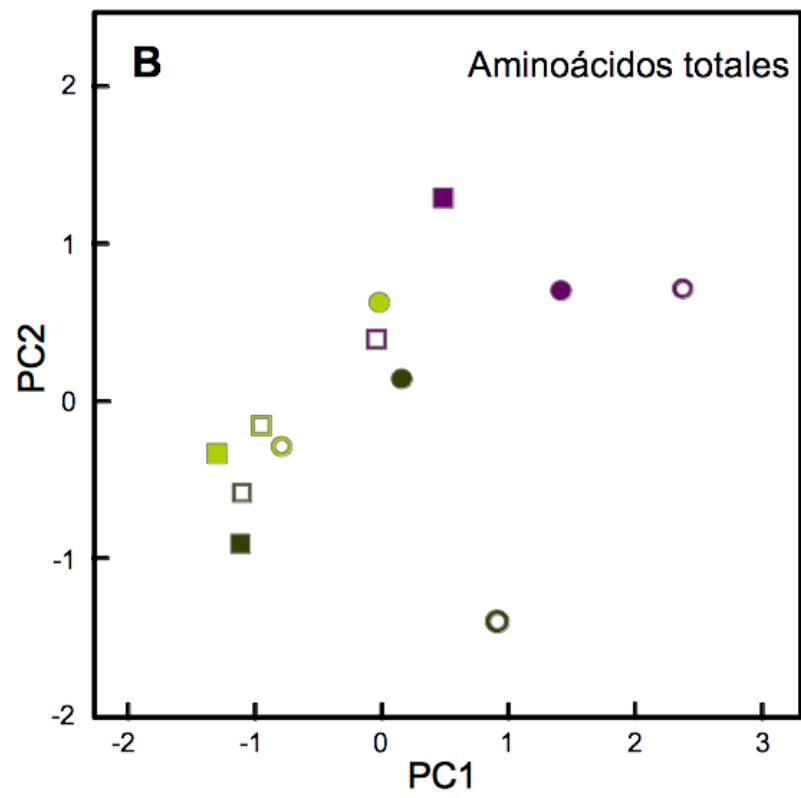
- El estado de maduración de las aceitunas es el factor que más marca la tendencia en la formación de grupos (coincidiendo con el resultado mostrado en la figura 45C y 45D). En concreto:

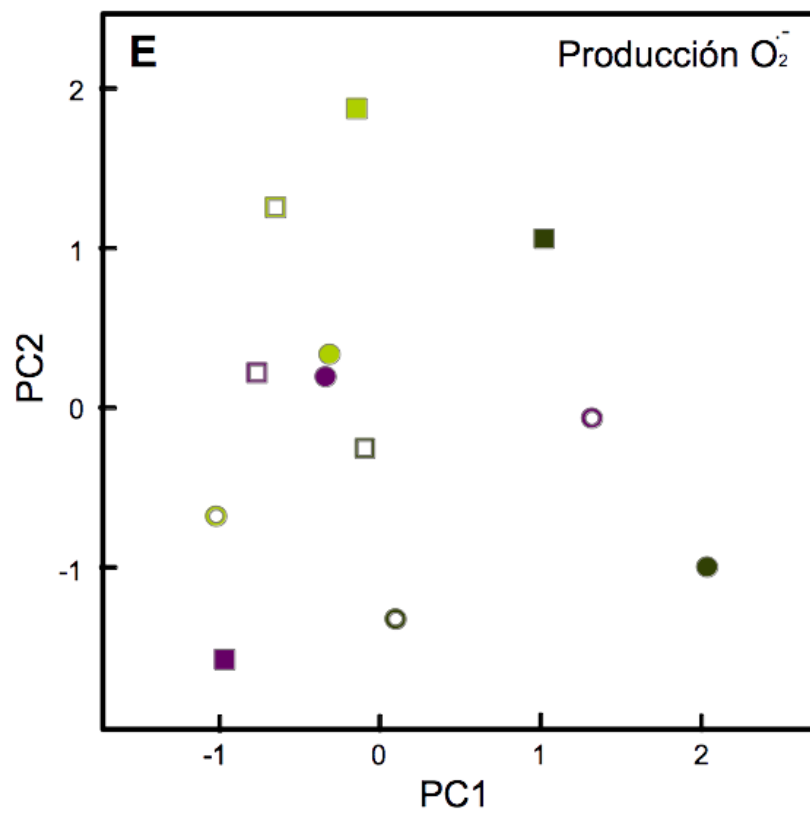
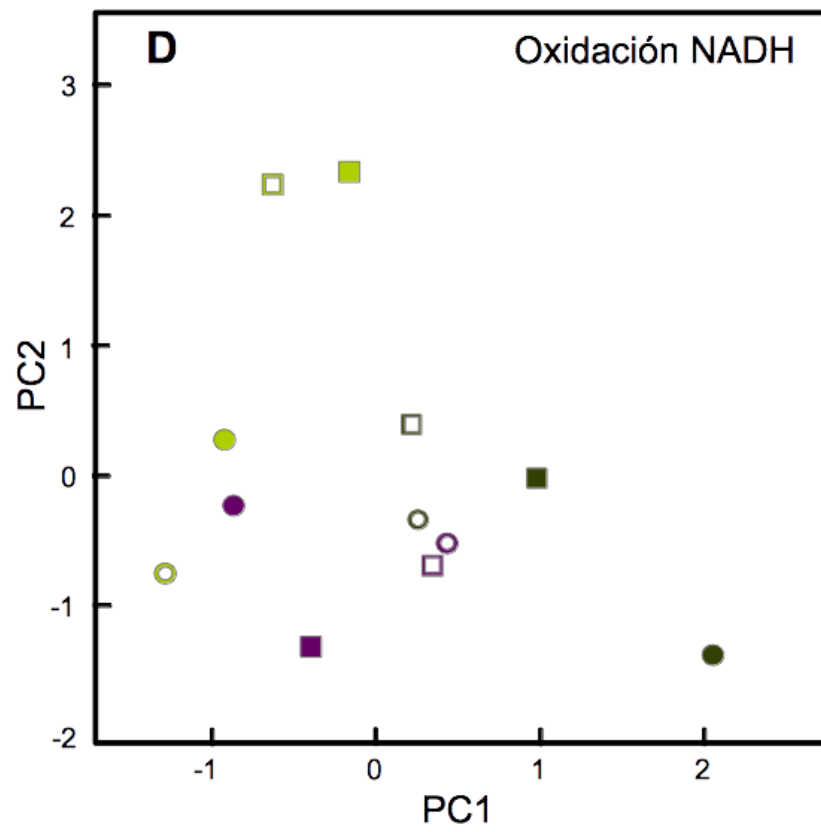
- Los fenoles (figura 49H) muestran una separación perfecta entre los diferentes estados de maduración, en menor medida lo hacen el contenido total de proteínas (figura 49C), la actividad POX

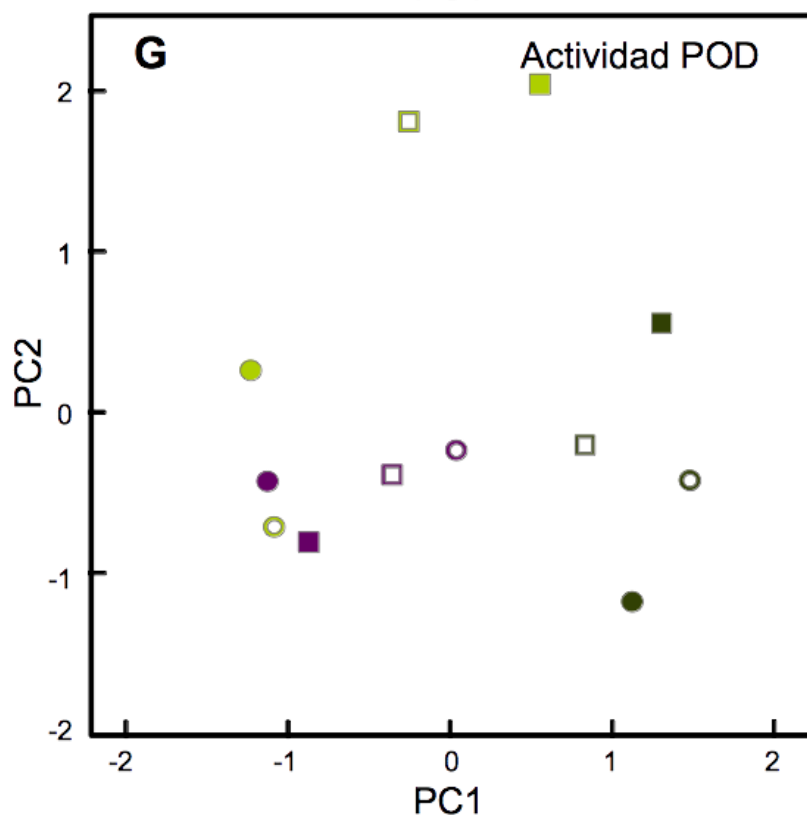
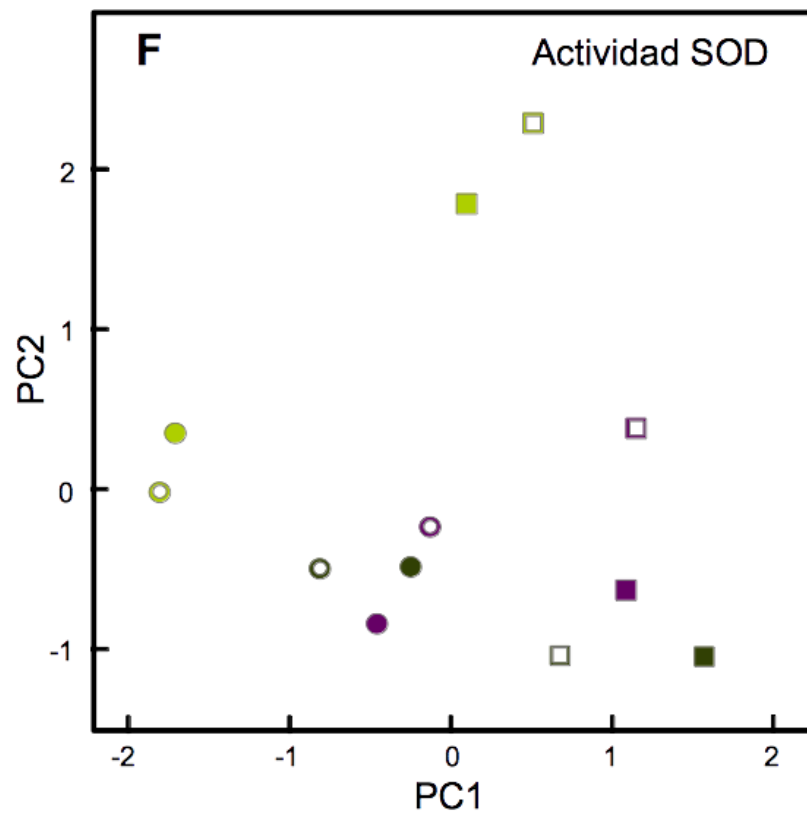
(figura 49G), el contenido total de flavonoides (figura 49I), los PPGs totales (figura 49J) y el FRAP (figura 49L).

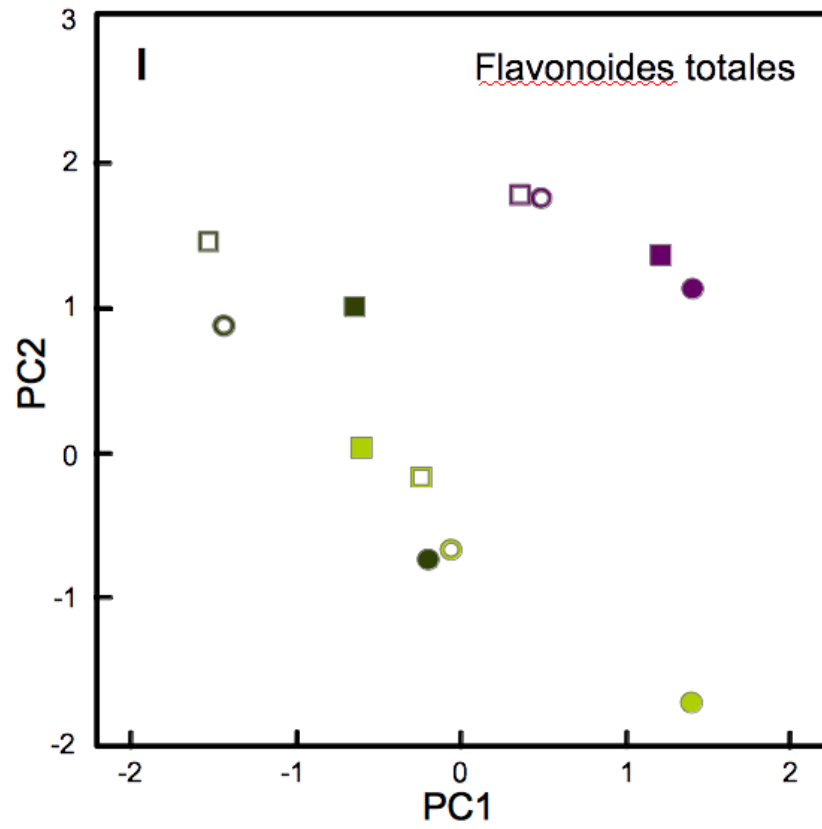
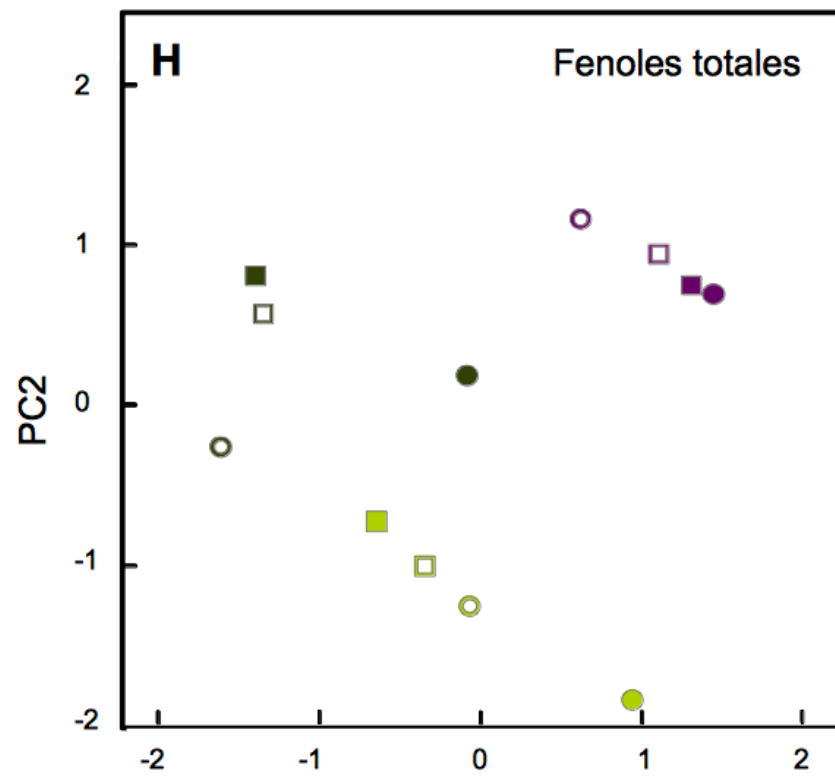
- La actividad SOD (figura 49F) en el estado E1 se diferencia claramente de los otros dos estados de maduración.
- En ningún caso se ha observado que la variedad y el aporte o no de riego tengan un efecto discriminante.

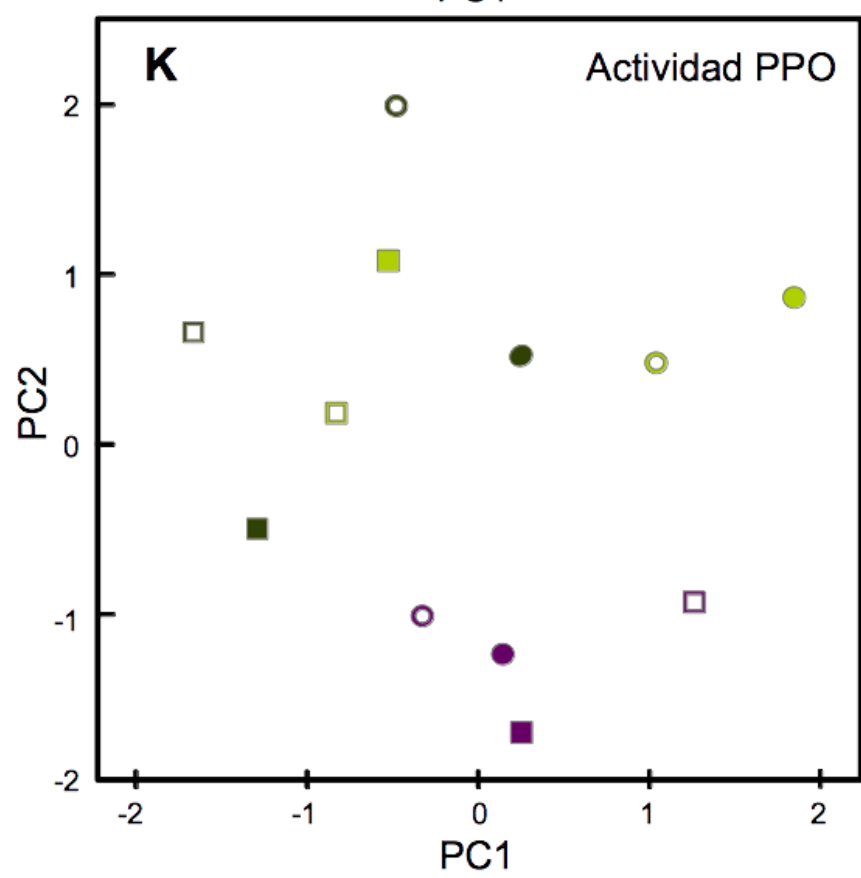
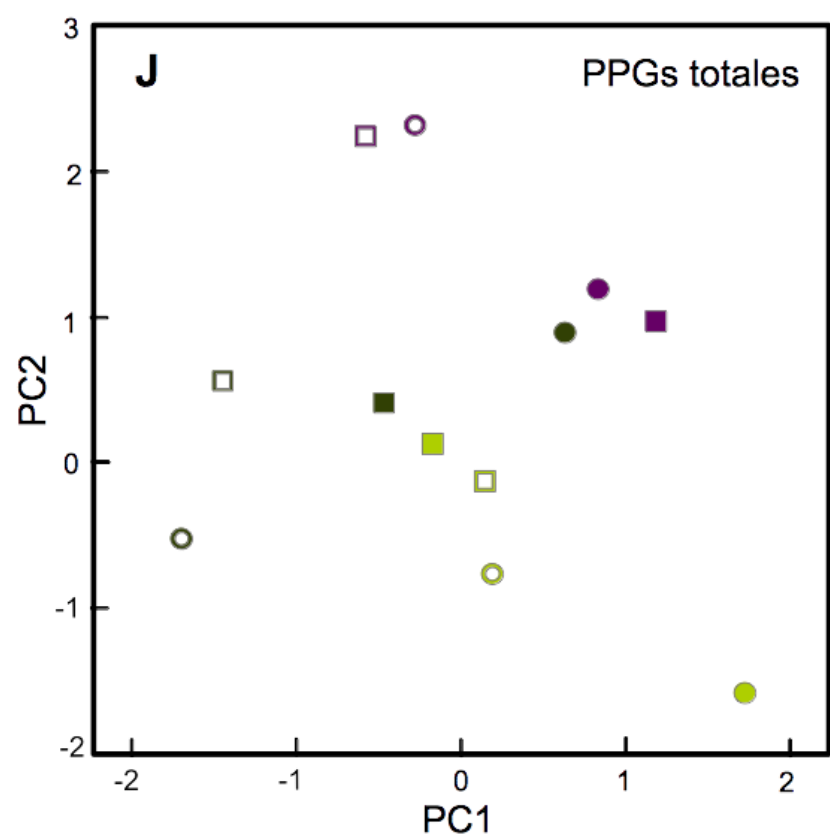












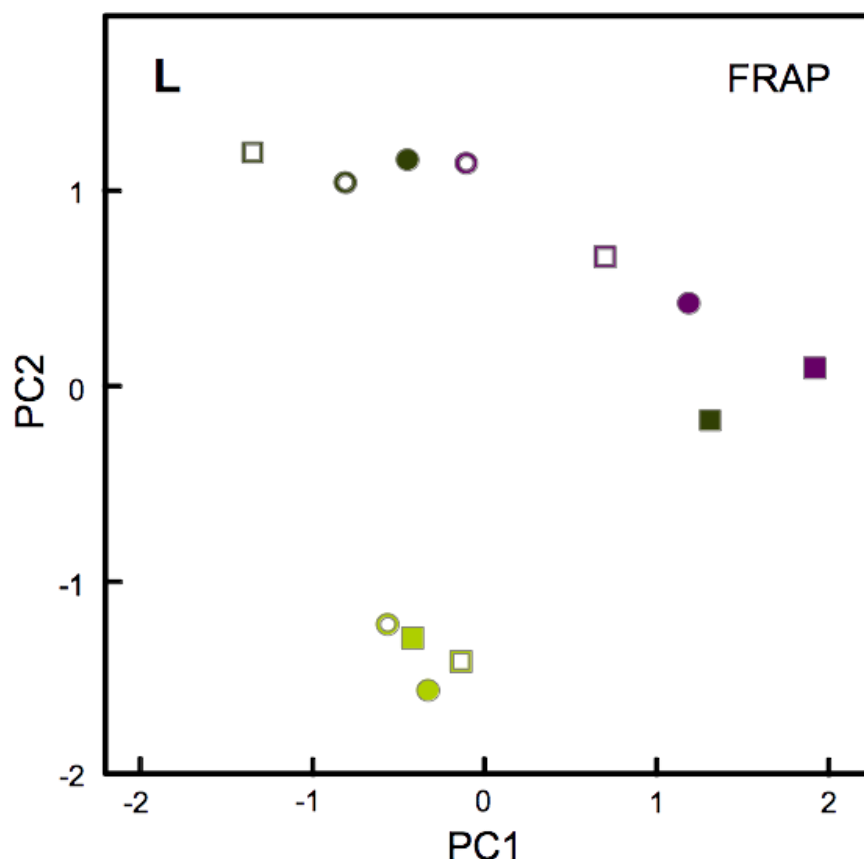


Figura 49. Mapas de la interestructura. Manzanilla seco -■- y regadío -□-, Morisca seco -●- y regadío -○-. Los estados de maduración E1, E2 y E3 como en la figura 45.

Este resultado muestra cómo aquellos componentes antioxidantes (como los compuestos de tipo fenólico) muy estrechamente relacionados con la maduración se agrupan entre sí, en respuesta al estado de maduración que las aceitunas presentan y de forma independiente de las condiciones de cultivo.

En contraste con el agrupamiento que presentan los compuestos fenólicos, las actividades enzimáticas oxidativas que se han determinado, como son la oxidación de NADH y la producción de O_2^- , actividades posiblemente consecuencia de la actuación de la Rboh y otras oxidasas, muestran mayor variabilidad. Estas actividades intervienen en la maduración pero, también están implicadas en la respuesta a procesos de choque oxidativo como consecuencia de estreses tanto bióticos como abióticos. Estos estreses pueden producirse en momentos muy variables del desarrollo y de forma independiente, por tanto, al proceso de maduración de los frutos, por ello no aparecen tan estrechamente asociadas al estado de maduración. En este punto, la variabilidad dependiendo del año (factores y estreses bióticos y abióticos) y también de las condiciones de cultivo (aporte o no de riego, relacionado en este último caso con un

cierto grado déficit o estrés hídrico) pueden ser más determinantes que en el caso de los compuestos fenólicos.

Un comportamiento similar al anteriormente descrito para las actividades oxidativas muestran las actividades enzimáticas antioxidantes, implicadas tanto en la respuesta al choque oxidativo inducido en respuesta a estreses como también en los procesos de maduración. En este caso, y como no dependen únicamente del estado de maduración, no se agrupan tan claramente dependiendo de este proceso. Así, las aceitunas procedentes de riego muestran características diferentes a la que desarrollan las aceitunas sometidas a condiciones de secano, estas últimas presentan mayor actividad de los sistemas enzimáticos antioxidantes. Este efecto puede deberse al desarrollo de, al menos en parte, un déficit hídrico provocado por la falta de riego. Este estrés actuaría induciendo un choque oxidativo en mayor o menor grado que debe ser contrarrestado por estas actividades enzimáticas para restaurar el equilibrio redox y la homeostasis celular. Es interesante también destacar cómo cuando se produce una agrupación dependiente del estado de maduración, p.e., contenido en los diferentes compuestos fenólicos estudiados, se observa cómo es la condición de cultivo la que muestra, sobre todo en E3 un subagrupamiento, mientras que la variedad no influye significativamente, lo que vendría a apoyar de cierta forma las diferencias provocadas por el déficit de aporte hídrico, aunque sea parcial. En este caso, el factor decisivo es por tanto el tipo de cultivo. Otros componentes como las proteínas muestran cómo la agrupación depende en parte del estado de maduración y en parte de la variedad, mientras que el factor menos influyente en este caso parece ser las condiciones de cultivo.

7.4.- Análisis de la evolución (trayectoria) de las variables en los diferentes años

El análisis de la trayectoria (figura 50) indica cómo varía el valor de una variable para cada una de las situaciones de estudio (en este caso el año). En las figuras 50A-C se muestra cómo se agrupan los valores obtenidos con respecto de los años.

Esta figura, además, puede interpretarse en términos de similitud (cuanto más cerca más similares). Así, se pueden observar los cambios en el sistema oxidativo y

antioxidante de las aceitunas, mostrándose en grupos opuestos al tener propiedades o funciones inversas:

- En el año 2011 se forman dos grupos de variables (figura 50A). Por un lado la oxidación de NADH y producción de O_2^- , las actividades SOD, de la POX, y PPO, este grupo estaría formado básicamente por los sistemas enzimáticos oxidantes y antioxidantes, actividades implicadas en el mantenimiento de la homeostasis redox celular (Mittler, 2002; Apel y Hirt, 2004; Foyer y Noctor, 2005; Kapoor et al., 2015); y, un segundo grupo formado por los compuestos fenólicos, ya sean fenoles totales, flavonoides o PPGs, capacidad antioxidante total (FRAP) y también aminoácidos y proteínas totales, y la relación entre pesos, es decir, en este otro grupo nos encontraríamos con los compuestos fenólicos antioxidantes y las proteínas que también pueden estar implicadas en la respuesta antioxidante (Mittler et al., 2004; Foyer y Noctor, 2011; Sharman et al., 2012; Kapoor et al., 2015).
- En el año 2012 (figura 50B) se forman también dos grupos de variables, tal y como sucede en el año 2011. Muy estrechamente unidos formando un subgrupo las actividades oxidativas y en otro subgrupo las antioxidantes. Otro grupo sería el formado por los compuestos fenólicos y en este caso también la actividad PPO, algo más alejados proteínas, aminoácidos y FRAP. Sin embargo, el cambio de cuadrante indica que, posiblemente, las características ambientales de ese año puedan haber contribuido a un cambio en el valor de las variables, sobre todo en las actividades enzimáticas, pero también en el resto de componentes (tabla 6). Así, las actividades responsables de la producción de ROS están muy estrechamente agrupadas, al igual que los compuestos y sistemas enzimáticos antioxidantes que aparecen muy estrechamente agrupados en subgrupos. En el mismo cuadrante se agrupan los compuestos antioxidantes y la capacidad antioxidante total, mientras que el sistema enzimático antioxidante lo hace en otro cuadrante, como en 2011, junto a las actividades responsables del estrés oxidativo, bien producido por la maduración o bien por otros condicionantes externos.
- Por último, en el año 2013 (figura 50C), se aprecian 3 grupos que siguen diferenciando claramente entre los sistemas enzimáticos por un lado, los

compuestos fenólicos antioxidantes junto a la actividad PPO por otro, y los aminoácidos, FRAP y PS/PF que aparecen más desligados.

En todos los casos, se observa cómo las actividades enzimáticas oxidantes y antioxidantes aparecen estrechamente unidas, al igual que lo hacen en otro agrupamiento fenoles, flavonoides, PPGs y FRAP. Esta agrupación se repite en todos los casos, siendo los años 2012 y 2013 muy similares.

Valores similares entre un año y otro implican trayectos o segmentos cortos. Así, cuanto mayor es la diferencia entre años, mayor será la trayectoria. Ese es el caso que se observa para la actividad PPO (figura 50D) que está en el tercer cuadrante en 2011, mientras que en 2012 lo está en el primero y en 2013 en el cuarto. Entre 2011 y 2012, la trayectoria indica una gran diferencia en los valores promedio, mientras que entre 2012 y 2013 el segmento corto radio indica un valor promedio similar. Por el contrario, la actividad FRAP y el contenido en aminoácidos solubles totales permanecen estables durante los 3 años en el primer cuadrante (figura 50A-C), lo que indica que sus valores no varían significativamente entre estos años.

La utilización de este sistema de estudio nos permite analizar en conjunto un gran número de variables que afectan de forma interdependiente la calidad final de las aceitunas y, por tanto, a los aceites vírgenes extraídos de ellas, siendo posible identificar los factores (variedad, riego/secano, año, estado de maduración) que más influyen sobre los sistemas oxidantes y antioxidantes, así como aminoácidos, peso fresco y peso seco, y poder antioxidante total en las aceitunas.

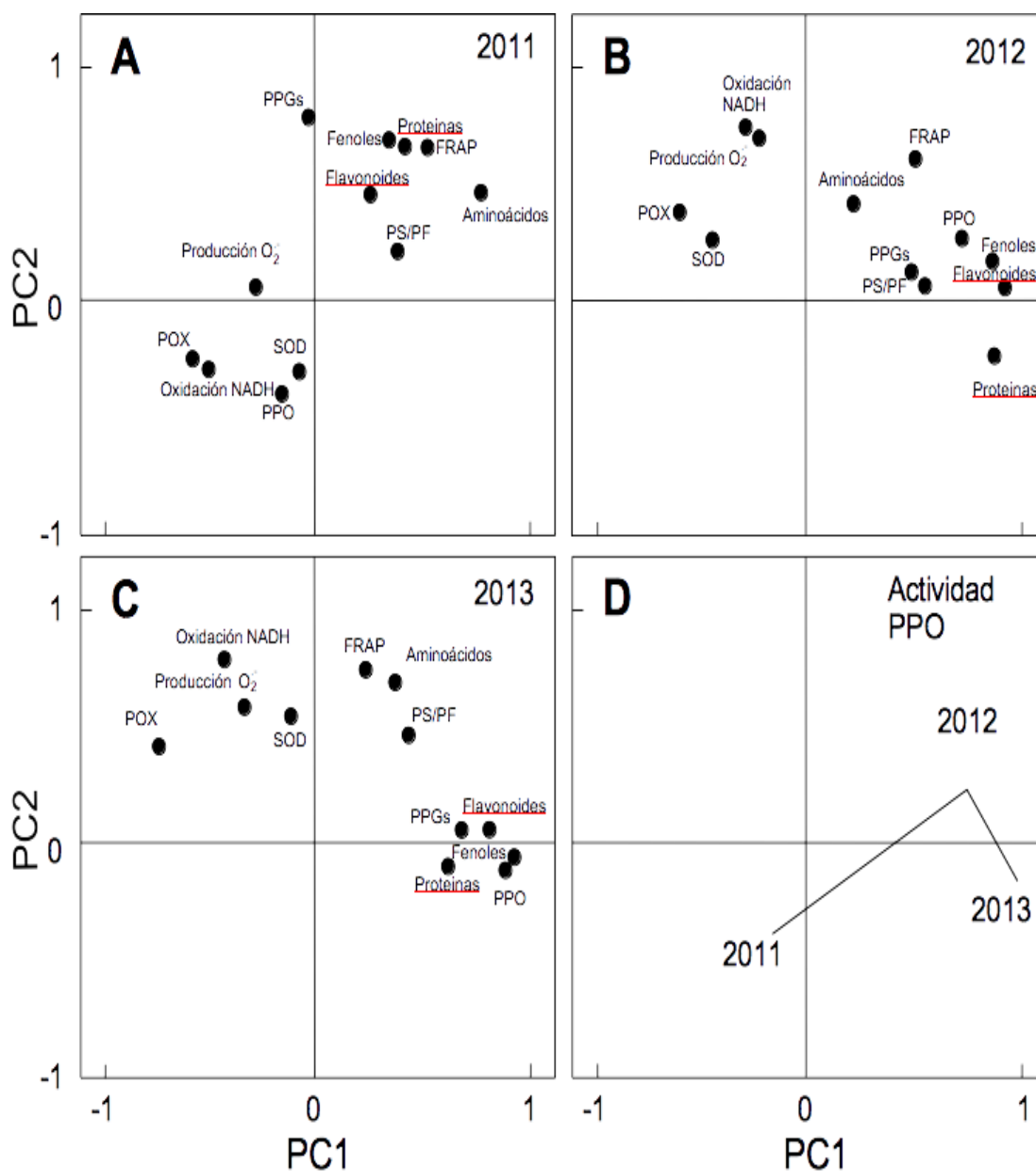


Figura 50. Mapas de la Intra-estructura. Fenoles, flavonoides y PPGs totales, PS/PF, aminoácidos solubles y proteínas totales, oxidación de NADH y producción de O_2^- , actividades SOD, POX y PPO, y poder reductor total FRAP, para los diferentes años, **A)** 2011, **B)** 2012 y **C)** 2013. **D)** Mapa de la intraestructura para la actividad PPO en 2011, 2012 y 2013.

Los resultados de este trabajo, así tratados, permiten obtener una visión más global y fácil de interpretar, en consonancia con Gourdol et al. (2013) y Darviche-Criado et al. (2015) quienes también aplican este sistema de estudio a la interpretación de datos sobre la influencia que múltiples variables, muchas de ellas difíciles de controlar, producen sobre la calidad de las aguas.

El análisis del espacio común es, por tanto, una buena aproximación al análisis vectorial de matrices de coeficientes de correlación que permitiría identificar la tercera

vía de los datos, cosa que es complicada con el análisis clúster y que además permite organizarlos cuando se tiene un volumen muy elevado de datos.

La utilización de esta metodología permite poder identificar cuál es el factor más influyente de entre un grupo de ellos, a pesar de las interacciones que puedan darse entre los mismos. Así, en este caso, es el estado de maduración de las aceitunas el factor que claramente discrimina, mucho más que la variedad a la que pertenecen los olivos, las técnicas de cultivo o incluso el año.

Este análisis permite visualizar cómo hay parámetros que se agrupan estrechamente entre sí al estar muy relacionados con procesos fisiológicos, en este caso la maduración. Los compuestos fenólicos y la capacidad antioxidante total muestran un agrupamiento muy fuerte, estrechamente relacionados, en los 3 años objeto de estudio. Algo similar ocurre con las actividades oxidantes y antioxidantes, aunque en este caso se observa también una influencia del factor año. El análisis evidencia cómo estos parámetros son más variables, al ser más dependientes de factores externos muy cambiantes, lo que no permite una agrupación tan estrecha y estable como en el caso de los compuestos fenólicos.

Conclusiones

1. La relación **PS/PF** se mantiene prácticamente constante durante todos los estados de maduración de las aceitunas estudiados. No se observan alteraciones de esta relación que sean dependientes ni de la variedad ni del año, tan sólo se puede observar una cierta influencia de aporte de riego, obteniéndose una menor relación PS/PF en las aceitunas procedentes de regadío, como por otra parte era de esperar al aumentar el contenido hídrico de estas aceitunas.
2. El **contenido total de aminoácidos solubles y proteínas** muestra un comportamiento similar, como por otra parte es normal dada su estrecha relación. Hay un incremento de ambos con el estado de maduración, siendo un parámetro muy variable, y dependiendo de gran cantidad de factores externos, siendo dependiente de la variedad.
3. La **oxidación de NADH y la producción de $O_2^{\cdot-}$** están muy relacionadas, observándose en ambos casos similares fluctuaciones, sin tendencia clara y sin efecto claro y determinante de alguno de los factores estudiados en cuanto a determinar su evolución. Este comportamiento es lógico ya que la RboH es la encargada de la generación de $O_2^{\cdot-}$, con NADH como donador de electrones por lo que ambas actividades son dependientes entre sí. Su efecto es aumentar tanto $O_2^{\cdot-}$ como H_2O_2 , que actúan como moléculas señal tanto a lo largo del proceso de maduración como en respuesta a los estreses ambientales.
4. Las **actividades enzimáticas antioxidantes SOD y POD** están involucradas en los procesos que mantienen el equilibrio redox mediante el control de la cantidad de ROS que se producen durante la maduración y en respuesta a estreses en las aceitunas. Estas actividades evolucionan muy relacionadas entre sí, con fluctuaciones similares y, además, relacionadas con la producción de ROS. Muestran una fuerte dependencia tanto de la variedad como de las condiciones de cultivo.

5. La **actividad PPO** está estrechamente relacionada con la actividad POD, que muestra una fuerte dependencia del estado de la maduración, aunque no se altera por las condiciones de cultivo. Por el contrario, la POD intervendría en ambos procesos. Estas dos actividades intervienen en el perfil fenólico durante la maduración de las aceitunas, oxidando glucósidos fenólicos y modulando tanto la maduración como las características fenólicas finales que las aceitunas presentan en el momento de la cosecha.
6. La evolución del **contenido total de fenoles, flavonoides y fenilpropanoides glicósidos**, muestra una gran variabilidad, y depende tanto del estado de maduración como de la variedad y, sobre todo, de las condiciones concretas que se han dado en el año de estudio ya que los fenoles forman parte de las respuestas a estreses, y están implicados en la eliminación de H_2O_2 , actuando como agentes detoxificadores.
7. La **actividad antioxidante total, FRAP**, es, en líneas generales, mayor en el estado más maduro y en condiciones de estrés hídrico, sin depender de la variedad.
8. La utilización del **sistema de análisis MDS-PTA** en este tipo de trabajo donde hay múltiples factores difíciles de visualizar y que generan una gran cantidad de datos, nos permite analizar un gran número de variables que afectan de forma interdependiente a la calidad final de las aceitunas y, por tanto, a los aceites vírgenes extraídos de ellas. Este estudio nos permite la identificación del factor o factores más decisivos a la hora de determinar las características del fruto. En nuestro caso, e independiente de cualquier otro de los factores estudiados, el estado de maduración.

Bibliografía

- Abdi, H. , Williams, L. J., Valentin, D. and Bennani-Dosse, M. (2012), STATIS and DISTATIS: optimum multitable principal component analysis and three way metric multidimensional scaling. WIREs Comp Stat, 4: 124-167. DOI:10.1002/wics.198
- Angles, S. (1999). The changes in the olive-growing geography of Andalusia. *Olivae* 78: 12–22
- Apel K, Hirt H. (2004). Reactive oxygen species: metabolism, oxidative stress, and signal transduction. *Annual Review of Plant Biology* 55:1, 373–399. DOI: 10.1146/annurev.arplant.55.031903.141701
- Arambourg Y. (1986). *Traité d'entomologie oléicole*. Madrid: Editions International Olive Oil Council. Consejo Oleicola Internacional. ISBN: 8439875835, 9788439875833
- Arnow L.E. (1937). Colorimetric determination of the components of 3,4-dihydroxyphenylalanine-tyrosine mixtures. *Journal of Biological Chemistry*. 118: 531-537
- Arslan D., Özcan M. (2011). Phenolic profile and antioxidant activity of olive fruits of the Turkish variety “Sarılak” from different locations. *Grasas y Aceites*, [S.l.], v. 62, n. 4, p. 453-461, dec. 2011. ISSN 1988-4214.
- Bafeel S.O., Ibrahim M.M. (2008). Antioxidants and accumulation of α -tocopherol induce chilling tolerance in *Medicago sativa*. *International Journal of Agriculture and Biology*. 10: 593–598. ISSN : 1560-8530
- Baldoni L, Tosti N, Ricciolini C, Belaj A, Arcioni S, Pannelli G, Germana MA, Mulas M, Porceddu A. (2006). Genetic structure of wild and cultivated olives in the central Mediterranean basin. *Ann. Bot.* 98, 935–942. DOI:10.1093/aob/mcl178
- Barnes J., Zheng Y., Lyons T. (2002) Plant Resistance to Ozone: the Role of Ascorbate. In: Omasa K., Saji H., Youssefian S., Kondo N. (eds) *Air Pollution and Plant Biotechnology*. Springer, Tokyo
- Barranco D., Rallo L. (2000). Olive cultivars in Spain. *Hort. Technol.* 10: 107-110
- Barranco D, Fernández-Escobar R y Rallo L. (2008). *El cultivo del olivo*. Eds. Mundiprensa-Junta de Andalucía. Madrid. ISBN: 9788484763291

- Bartolini G, Prevost G, Messeri C, Carignani C, Carignani G. (2005). Olive germplasm: cultivars and world-wide collections. FAO. URL <http://apps3.fao.org/wiews/olive/oliv.jsp>. Fecha de acceso: 19/08/16
- Beaucham C., Fridovich I. (1971). Superoxide dismutase: Improved assays and an assay applicable to acrylamide gels. *Analytical Biochemistry*. 44: 276-287. DOI:10.1016/0003-2697(71)90370-8
- Beaufoy G. (1998). The reform of the CAP olive-oil regime: What are the implications for environment?. Hampshire: European Forum on Nature Conservation and Pastoralisme. Occasional publication No 14
- Belaj A., Domínguez-García M.C., Atienza S.G. Martínez-Urdiroz N., De la Rosa R., Satovic Z., Martín A., Kilian A., Trujillo I., Valpuesta V., Del Rio C. (2012). Developing a core collection of olive (*Olea europaea* L.) based on molecular markers (DARts, SSRs, SNPs) and agronomic traits. *Tree Genetics and Genomes*. 8: 365-378. DOI:10.1007/s11295-011-0447-6
- Belaj A, Muñoz-Diez C, Baldoni L, Satovic Z, Barranco D. 2010. Genetic diversity and relationships of wild and cultivated olives at regional level in Spain. *Scientia Horticulturae* 124: 323–330. DOI: 10.1016/j.scienta.2010.01.010
- Belaj A, Satovic Z, Cipriani G, Baldoni L, et al. (2003). Comparative study of the discriminating capacity of RAPD, AFLP and SSR markers and of their effectiveness in establishing genetic relationships in olive. *Theor. Appl. Genet.* 107: 736-744. DOI: 10.1007/s00122-003-1301-5
- Belaj A, Satovic Z, Trujillo I and Rallo L (2004). Genetic relationships and partition of variability of Spanish olive cultivars by means of RAPD markers. *Hort. Sci.* 39: 948-951
- Belaj A, Trujillo I, De la Rosa R and Rallo L (2001). Polymorphism and discrimination capacity of randomly amplified polymorphic markers in an olive germplasm bank. *J. Am. Soc. Hort. Sci.* 126: 64-71
- Benzie I.E.F., Strain J.J. (1996). The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of antioxidant power: The FRAP assay. *Annals Biochemistry*. 239: 70-76. DOI: 10.1006/abio.1996.0292

- Besnard G, Baradat P, Breton C, Khadari B, Bervillé A. (2001). Olive domestication from structure of oleasters and cultivars using nuclear RAPDs and mitochondrial RFLPs. *Genet. Sel. Evol.* 33, S251–S268.
- Besnard G., Khadari B., Villemur P., Bervillé A. (2000). Cytoplasmic male sterility in the olive (*Olea europaea* L.). *Theor Appl Genet* (2000) 100:1018–1024
- Besnard G, Khadari B, Navascués M, Fernández-Mazuecos M, El Bakkali A, Arrigo N, Baali-Cherif D, Brunini-Bronzini de Caraffa V, Santoni S, Vargas P et al. (2013). The complex history of the olive tree: from Late Quaternary diversification of Mediterranean lineages to primary domestication in the northern Levant. *Proceedings. Biological sciences/The Royal Society* 280: 20122833. DOI: 10.1098/rspb.2012.2833
- Besnard G, Rubio de Casas R, Vargas P. (2007). Plastid and nuclear DNA polymorphism reveals historical processes of isolation and reticulation in the olive tree complex (*Olea europaea* L.). *J. Biogeogr.* 34, 736–752. DOI:10.1111/j.1365-2699.2006.01653.x
- Bienert G.P., Møller A.L.B., Kristiansen K.A., Schulz A., Møller I.M., Schjoerring J.K., Jahn T.P. (2007). Specific aquaporins facilitate the diffusion of hydrogen peroxide across membranes. *Journal of Biological Chemistry.* 282:1183-1192. DOI: 10.1074/jbc.M603761200
- Blokhina O., Fagerstedt K.V. (2010). Reactive oxygen species and nitric oxide in plant mitochondria: origin and redundant regulatory systems. *Physiologia Plantarum.* 138: 447-462. DOI:10.1111/j.1399-3054.2009.01340.x
- Blondel J., Aronson J. (1995). Biodiversity and Ecosystem Function in the Mediterranean Basin: Human and Non-Human Determinants. George W. Davis, David M. Richardson (Eds.), *Mediterranean-Type Ecosystems. Ecological Studies*, Vol. 109, 43-119, 1995. DOI:10.1007/978-3-642-78881-9_2
- Blondel JJ, Aronson J, Bodiou JY, Boeuf G. (2010) *The Mediterranean region: biological diversity in space and time.* Oxford, UK: Oxford University Press
- Borg I., Groenen P. (2010). *Modern multidimensional scaling*, Springer-Verlag, New York (2nd Ed.). DOI:10.1111/j.1745-3984.2003.tb01108.x

- Bowler C., Van Montagu M., Inzé D. (1992). Superoxide dismutase and stress tolerance. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*. 43: 83-116. DOI:10.1146/annurev.pp.43.060192.000503
- Bradford M.M. (1976). A rapid and sensitive method for quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*. 72: 248–259. DOI:10.1016/0003-2697(76)90527-3
- Braudel F. (1979). *La Méditerranée et le monde méditerranéen à l'époque de Philippe II*, tome premier, tome deuxième, 4th edn. Paris: Librairie Armand Colin
- Breton C., (2006). Reconstruction de l'histoire de l'olivier (*Olea europaea subsp. europaea*) et de son processus de domestication en région méditerranéenne, étudiés sur des bases moléculaires, pp 210. Thèse Doctorat Biologie des populations et Écologie, Université Paul Cézanne, 2006, France. PhD thesis
- Breton C., Bervillé A. (2009). The life history of the olive tree examined through molecular marker data. In: Berti L, Maury J, editors. *Advances in olive resources*. Kerala, India: Transworld Research Network pp 105-135
- Breton C., Guerin J., Ducatillion C., Médail F., Kull C.A., Berville A (2008) Taming the wild and 'wilding' the tame: tree breeding and dispersal in Australia and the Mediterranean. *Plant Sci* 175:197–205. DOI:10.1016/j.plantsci.2008.05.013
- Breton C., Terral J.F., Pinatel C., Médail F., Bonhomme F., Berville A. (2009). The origins of the domestication of the olive tree. *Comptes Rendus Biol.* 332, 1059–1064. DOI:10.1016/j.crvi.2009.08.001
- Breton C., Warnock P., Berville A. (2012). Origins and History of the olive. In *Olive Germplasm – The Olive Cultivation, Table Olive and Olive Oil Industry in Italy*. Intech Ed. DOI:10.5772/51933
- Bronzini de Caraffa V., Giannettini J., Gambotti C., Maury J. (2002). Genetic relationships between cultivated and wild olives of Corsica and Sardinia using RAPD markers. *Euphytica* 123: 263-271
- Brot N., Weissbach H. (1982). The biochemistry of methionine sulfoxide residues in proteins. *Trends in Biochemical Sciences*. 7: 137-139. DOI:10.1016/0968-0004(82)90204-3

- Cabisco E., Piulats E., Echave P., Herrero E., Ros J. (2000). Oxidative stress promotes specific protein damage in *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Biological Chemistry*. 35: 27393-27398. DOI: 10.1074/jbc.M003140200
- Carrión Y, Ntinou M, Badal E. (2010). *Olea europea* L. in the North Mediterranean Basin during the Pleniglacial and the Early–Middle Holocene. *Quaternary Science Reviews*. 29: 952–968. DOI:10.1016/j.quascirev.2009.12.015
- Cerretani L., Bendini A., Rotondi A., Mari M., Lercker G., Toschi T. (2004). Evaluation of the oxidative stability and organoleptic properties of extra-virgin olive oils in relation to olive ripening degree. *Prog. Nutr.* 6: 50–56.
- Chatteron L., Chatteron B. (1981). Compacting desertification in winter rainfall regions of North Africa and Middle East. *Outlook on Agriculture* 10(8): 397–402. DOI:10.1177/003072708101000806
- Choudhury F.K., Rivero R.M., Blumwald E., Mittler R. (2017). Reactive oxygen species, abiotic stress and stress combination. *The Plant Journal* 90: 856–867. DOI: 10.1111/tpj.13299
- Cirilli M., Caruso G., Gennai C., Urbani S., Frioni E., Ruzzi M., Servili M., Gucci R., Poerio E., Muleo R. (2017). The Role of Polyphenoloxidase, Peroxidase, and β -Glucosidase in Phenolics Accumulation in *Olea europaea* L. Fruits under Different Water Regimes. *Frontiers in Plant Science*, Vol. 8, Pages 717, DOI=10.3389/fpls.2017.00717
- Corpas F.J., Palma J.M., Sandalio L.M., Valderrama R., Barroso J.B., Del Río L.A. (2008). Peroxisomal xanthine oxidoreductase: characterization of the enzyme from pea (*Pisum sativum* L.) leaves. *Journal of Plant Physiology*. 165: 1319-1330. DOI:10.1016/j.jplph.2008.04.004
- Darwiche-Criado N., Jiménez J.J., Comín F.A., Sorando R., Sánchez-Pérez J.M., (2015). Identifying spatial and seasonal patterns of river water quality in a semiarid irrigated agricultural Mediterranean basin. *Environ SciPollut Res* 22:18626-18636. DOI: 10.1007/s11356-015-5484-5
- Das K., Roychoudhury A. (2014) Reactive oxygen species (ROS) and response of antioxidants as ROS-scavengers during environmental stress in plants. *Frontiers in environmental Science*. Vol 2 Art. 53: 1-13. DOI:10.3389/fenvs.2014.00053

- Dat, J., Vandenabeele S., Vranov'a E., Van Montagu M., Inzé D., Van Breusegem F. (2000). Dual action of the active oxygen species during plant stress responses. *Cellular and Molecular Life Sciences*. 57: 779-795. DOI:10.1007/s000180050
- De Candolle A. (1886). *Origine des plantes cultivées*. F. Alcant Ed. Paris.
- De Graaff, J., Eppink L.A.A.J. (1999). Olive oil production and soil conservation in Southern Spain in relation to EU subsidy policies. *Land Use Policy* 16: 259–267. DOI:10.1016/S0264-8377(99)00022-8
- De Pinto M.C., De Gara L. (2004). Changes in the ascorbate metabolism of apoplastic and symplastic spaces are associated with cell differentiation. *Journal of Experimental Botany*. 55: 2559-2569. DOI: 10.1093/jxb/erh253
- Debusshe M., Isenmann P. (1985). La regime alimentaire de la Grive musicienne (*Turdus filimelos*) en automne et en hiver dans les Garrigues de Montpellier (France Mediterranee) et ses relations avec l'ornithochorie. *Terre et Vie* 40: 379– 387
- Demidchik V. (2015). Mechanisms of oxidative stress in plants: From classical chemistry to cell biology. *Environmental and Experimental Botany*. 109:212-228. DOI: 10.1016/j.envexpbot.2014.06.021
- Del Río L.A., Sandalio L.M., Corpas F.J., Palma J.M., Barroso J.B. (2006). Reactive oxygen species and reactive nitrogen species in peroxisomes. Production, scavenging, and role in cell signaling. *Plant Physiology*. 141: 330-335. DOI: 10.1104/pp.106.078204
- Delgado-Martinez FJ (2006). *Caracterización y Desarrollo de Marcadores Moleculares SSR para la Identificación de Variedades Autóctonas de Olivo en Extremadura*. Master's thesis, University of Extremadura, Badajoz
- Delgado-Martinez FJ, Amaya I, Sanchez-Sevilla JF and Gomez-Jimenez MC (2011). Microsatellite marker-based identification and genetic relationships of olive cultivars from the Extremadura region of Spain. *Genet. Mol. Res.* 11: 918-932. <http://dx.DOI:10.4238/2012>
- Diamond J. (2002). Evolution, consequences and future of plant and animal domestication. *Nature* 418, 700–707. DOI:10.1038/nature01019

- Díaz A, De la Rosa R, Martín A and Rallo P (2006). Development, characterization and inheritance of new microsatellites in olive (*Olea europaea* L.) and evaluation of their usefulness in cultivar identification and genetic relationship studies. *Tree Genet. Genomes* 2: 165-175. DOI:10.1007/s11295-006-0041-5
- Diez CM, Imperato A, Rallo L, Barranco D, Trujillo I. (2012). Worldwide core collection of olive cultivars based on simple sequence repeat and morphological markers. *Crop Science* 52: 211
- Diez CM, Trujillo I., Martinez-Urdiroz N., Barranco D, Rallo L, Marfil P, Gaut BS. (2015) Olive domestication and diversification in the Mediterranean Basin. *New Phytologist*- 206: 436-447. DOI: 10.1111/nph.13181
- Dizdaroglu M. (1993). Chemistry of free radical damage to DNA and nucleoproteins. In: B Halliwell and OI Aruoma (eds): *DNA and Free Radicals*. Ellis Horwood, Chichester, pp 19–39
- Drogue S. (2000). Modelling of the European community olive oil market. *Olivae* 80: 8–11. ISSN : 0255-9994
- Ebrahimzadeh H., Motamed N., Rastgar-Jazii F., Montasser-Kouhsari S., Shokraii E.H. (2003). Oxidative enzyme activities and soluble protein content in leaves and fruits of olives during ripening. *J. Food Biochem* 27: 181–196. <https://doi.org/10.1111/j.1745-4514.2003.tb00276.x>
- Edwards E.A., Rawsthorne S., Mullineaux P.M. (1990). Subcellular distribution of multiple forms of glutathione reductase in leaves of pea (*Pisum sativum* L.). *Planta*. 180: 278-284. DOI:10.1007/BF0019400
- El Bakkali A, Haouane H, Moukhli A, Costes E, Van Damme P, Khadari B. (2013). Construction of core collections suitable for association mapping to optimize use of Mediterranean olive (*Olea europaea* L.) genetic resources. *PLoS ONE* 8: e6126. DOI:10.1371/journal.pone.0061265
- Elstner E.F. (1982). Oxygen activation and oxygen toxicity. *Annual Review of Plant Biology*. 33: 73-96. DOI: /10.1146/annurev.pp33.060182.000445
- Elstner E.F. (1987). Metabolism of activated oxygen species. in *Biochemistry of Plants*. D. D. Davies, Ed., pp. 253–315, Academic Press, London, UK. DOI:10.1016/B978-0-12-675411-7.50014-8

- Erre P., Chessa I., Muñoz-Diez C., Belaj A., Rallo L., Trujillo I. (2010). Genetic diversity and relationships between wild and cultivated olives (*Olea europaea* L.) in Sardinia as assessed by SSR markers *Genet Res Crop Evol* 57:41-54. DOI: 10.1007/s10722-009-9449-8
- Figueiral I., Terral J.F. (2002). Late quaternary refugia of Mediterranean taxa in the portuguese estremadura: charcoal based paleovegetation and climatic reconstruction. *Quaternary Science Reviews*, 21, 549-558. DOI:10.1016/S0277-3791(01)00022-1
- Fink S.P., Reddy G.R., Marnett L.J. (1997). Mutagenicity in *Escherichia coli* of the major DNA adduct derived from the endogenous mutagen malondialdehyde. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 94: 8652-8657. DOI:10.1073/pnas.94.16.8652
- Finlayson J.C. (1981). Seasonal distribution, weights and fat of passerine migrants at Gibraltar. *Ibis* 123: 88–95. DOI:10.1111/j.1474-919X.1981.tb00176.x
- Foyer C.H. (1997). Oxygen metabolism and electron transport in photosynthesis. in *Molecular Biology of Free Radical Scavenging Systems*, J. Scandalios, Ed., pp. 587–621, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, NY, USA. DOI: 10.1101/087969502.34.587
- Foyer C.H., Harbinson J. (1994). Oxygen metabolism and the regulation of photosynthetic electron transport. in *Causes of Photooxidative Stresses and Amelioration of Defense Systems in Plants*, C. H. Foyer and P. Mullineaux, Eds., pp. 1–42, CRC Press, Boca Raton, Fla, USA
- Foyer C.H., Lopez-Delgado H., Dat J.F., Scott I.M. (1997). Hydrogen peroxide- and glutathione-associated mechanisms of acclimatory stress tolerance and signaling. *Physiologia Plantarum*. 100: 241-254. DOI: /10.1111/j.1399-3054.1997.tb04780.x
- Foyer C.H., Noctor G. (2005). Oxidant and antioxidant signalling in plants: a re-evaluation of the concept of oxidative stress in a physiological context. *Plant, Cell and Environment*. 28: 1056-1071. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3040.2005.01327>.

- Foyer C.H., Noctor G. (2011). Ascorbate and glutathione: the heart of the redox hub. *Plant Physiol.* 155: 2-18. DOI: <https://doi.org/10.1104/pp.110.167569>
- Fresco L.O. (1996). Agriculture in the Lower Guadalhorce Valley. Sustainable Land Use. Practical Guide for the Alora Region, Spain. Wageningen, The Netherlands: Agricultural University
- Fridovich I. (1989). Superoxide dismutases. An adaptation to a paramagnetic gas. *Journal of Biological Chemistry.* 264: 7761-7764
- Fry S.C. (1998) Oxidative scission of plant cell Wall polysaccharides by ascorbate-induced hydroxyl radicals. *Biochem J.* 332:507-515
- Fryer M.J. (1992). The antioxidant effect of thylakoid vitamin-E (α -tocopherol). *Plant, Cell and Environment.* 15: 381-392. DOI:10.1111/j.1365-3040.1992.tb00988.x
- Gálvez M., Martín-Cordero C., Houghton P.J., Ayuso M.J. (2005). Antioxidant activity of methanol extracts obtained from *Plantago* species. *Journal of Agricultural and Food Chemistry.* 53: 1927-1933. DOI: 10.1021/jf048076s
- Gamero E., Moreno D., Talaverano I., Prieto M.H., Guerra M.T., Valdés M.E. (2014). Effects of irrigation and cluster thinning on Tempranillo grape and wine composition. *South African Journal of Enology and Viticulture* 35: 196-204 DOI: <https://doi.org/10.21548/35-2-1006>
- Gao Q., Zhang L. (2008). Ultraviolet-B-induced oxidative stress and antioxidant defense system responses in ascorbate deficient vtc1 mutants of *Arabidopsis thaliana*. *Journal of Plant Physiology.* 165: 138-148. DOI: 10.1016/j.jplph.2007.04.002
- García-Rodríguez R., Romero-Segura C., Sanz C., Sánchez-Ortiz A., Pérez A.G. (2011) Role of polyphenol oxidase and peroxidase in shaping the phenolic profile of virgin olive oil. *Food Res. Int.* 44: 629-635. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2010.12.023>
- Ghisla S., Massey V. (1989). Mechanisms of flavoprotein catalyzed reactions. *European Journal of Biochemistry.* 181: 1-17. DOI:10.1111/j.1432-1033.1989.tb14688.x

- Gill S.S., Tuteja N. (2010). Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants. *Plant Physiology and Biochemistry* 48: 909-930. DOI: 10.1016/j.plaphy.2010.08.016
- Giourga H., Margaritis N.S., Vokou D. (1998). Effects of grazing pressure on succession process and productivity of old fields on Mediterranean islands. *Environmental Management* 22(4): 589–596
- González Bartolomé D, (2015), Análisis de tablas de tres entradas como herramienta en las Ciencias Atmosféricas, Estudio de las depresiones del Golfo de Génova y del Golfo de Cádiz mediante el STATIS DUAL y el Análisis Parcial Triádico, Trabajo de Fin de Máster, Universidad de Salamanca
- Gonzalo-Claros M., Crespillo R., Aguilar M.L., Cánovas F.M. (2000). DNA fingerprinting and classification of geographically related genotypes of olive-tree (*Olea europaea* L.). *Euphytica* 116: 131-142
- Gourdol L., Hissler C., Hoffmann L., Pfister L. (2013). On the potential for the Partial Triadic Analysis to grasp the spatio-temporal variability of groundwater hydrochemistry. *Applied geochemistry* 39: 93-107. DOI:10.1016/j.apgeochem.2013.10.002
- Grace S.C., Logan B.A. (2000). Energy dissipation and radical scavenging by the plant phenylpropanoid pathway. *Philosophical Transactions of the Royal Society B*. 355: 1499-1510. DOI:10.1098/rstb.2000.0710
- Guardado-Félix D., Serna-Saldivar S., Cuevas-Rodríguez, Jacobo-Velázquez D., Gutiérrez-Urbe A. (2017). Effect of sodium selenite on isoflavonoid contents and antioxidant capacity of chickpea (*Cicer arietinum* L.) sprouts, *Food Chemistry*, Volume 226, 2017, Pages 69-74, ISSN 0308-8146, <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.01.046>.
- Gupta A.S., Heinen J.L., Holaday A.S., Burke J.J., Allen R.D. (1993). Increased resistance to oxidative stress in transgenic plants that overexpress chloroplastic Cu/Zn superoxide dismutase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 90: 1629-1633. DOI: 10.1073/pnas.90.4.1629
- Guzman Alvarez J.R. (1999). Olive cultivation and ecology: The situation in Spain. *Olivae* 78: 41–49

- Hackbarth S., Schlothauer J., Preuss A., Röder B. (2010). New insights to primary photodynamic effects—singlet oxygen kinetics in living cells. *Journal of Photochemistry and Photobiology. B, Biology.* 98: 173-179. DOI:10.1016/j.jphotobiol.2009.11.013
- Halliwell B., Aruoma O.I. (1991). DNA damage by oxygen-derived species. Its mechanism and measurement in mammalian systems. *FEBS Letters.* 281: 9-19. DOI:10.1016/0014-5793(91)80347-6
- Halliwell B., Gutteridge J-M-C. (1999). *Free Radicals in Biology and Medicine.* Oxford University Press, Oxford, UK, 3rd edition
- Han C., Liu Q., Yang Y. (2009) Short-term effects of experimental warming and enhanced ultraviolet-B radiation on photosynthesis and antioxidant defense of *Picea asperata* seedlings. *Plant Growth Regulation.* 58:153-162. DOI: 10.1007/s10725-009-9363-2
- Hannachi H., Breton C., Msallem M., Ben El Hadj S., El Gazzah M. (2010). Genetic Relationships between Cultivated and Wild Olive Trees (*Olea Europaea* L. Var. *Europaea* and Var. *Sylvestris*) Based on Nuclear and Chloroplast SSR Markers. *Natural Resources*, Vol. 1 No. 2, pp. 95-103. DOI: 10.4236/nr.2010.12010.
- Haouane H, El Bakkali A, Moukhli A, Tollon C, Santoni S, Oukabli A, El Modafar C, Khadari B (2011). Genetic structure and core collection of the World Olive Germplasm Bank of Marrakech: towards the optimised management and use of Mediterranean olive genetic resources. *Genetica* 139: 1083–1094. DOI: 10.1007/s10709-011-9608-7
- Hatz S., Lambert J.D.C., Ogilby P.R. (2007). Measuring the lifetime of singlet oxygen in a single cell: addressing the issue of cell viability. *Photochemical and Photobiological Sciences.* 6:1106-1116. DOI: 10.1039/B707313E
- Hbaieb H., Rim & Kotti, Faten & Cortés, Nuria & Caixach, Josep & Gargouri, Mohamed & Vichi, Stefania. (2016). Ripening and storage conditions of Chétoui and Arbequina olives: Part II. Effect on olive endogenous enzymes and VOO secoiridoid profile determined by HRMS. *Food Chemistry.* 210. 10.1016/j.foodchem.2016.05.026

- Hernández J.A., Ferrer M.A., Jiménez A., Barceló A.R., Sevilla F. (2001). Antioxidant systems and O_2^- /H₂O₂ production in the apoplast of pea leaves. Its relation with salt-induced necrotic lesions in minor veins. *Plant Physiology*. 127: 817–831. DOI:10.1104/pp.010188
- Hernández M., Astray G., Larios D., Espinosa F. (2015). Identification of Relevant Phytochemical Constituents for Characterization and Authentication of Tomatoes by General Linear Model Linked to Automatic Interaction Detection (GLM-AID) and Artificial Neural Network Models (ANNs). *Plos One* 10 (6): e128566. DOI 10.1371/journal.pone.0128566
- Heyno E., Mary V., Schopfer P., Krieger-Liszkay A. (2011) Oxygen activation at the plasma membrane: relation between superoxide and hydroxyl radical production by isolated membranes. *Planta* 234: 35-45. DOI: 10.1007/s00425-011-1379
- Hornero-Méndez D., Gallardo-Guerrero L., Jarén-Galán M., Mínguez-Mosquera M.I. (2002) Differences in the activity of superoxide dismutase, polyphenol oxidase and Cu-Zn content in the fruits of Gordal and Manzanilla olive varieties. *Z. Naturforschung C*. 57:113–20. <https://doi.org/10.1515/znc-2002-1-220>
- Hossain M.A., Asada K. (1985). Monodehydroascorbate reductase from cucumber is a flavin adenine dinucleotide enzyme. *Journal of Biological Chemistry*. 260: 12920-12926.
- Hu X., Song S, Shi K., Xia X.J., Zhou Y.H., Yu J.Q. (2008). Changes in electron transport, superoxide dismutase and ascorbate peroxidase isoenzymes in chloroplasts and mitochondria of cucumber leaves as influenced by chilling. *Photosynthetica*. 46: 581–588. DOI:10.1007/s11099-008-0098-5
- Huan Feng, Huey-wen Chuang & Yung-Lin Feng (2016) The role of arabidopsis WDR protein in plant growth and defense strategies, *Plant Signaling & Behavior*, 11:8,
- ICEX-Madrid (2004). Div. Productos Agroalimentarios. Marzo 2004
- Imlay J.A., Linn S. (1988). DNA damage and oxygen radical toxicity. *Science*. 240: 1302-1309. DOI: 10.1126/science.3287616

- Interprofesional (2010). Dossier Informativo. Aceite de oliva de España. Campaña de Promoción exterior 2010
- Ivanov B., Khorobrykh S. (2003). Participation of photosynthetic electron transport in production and scavenging of reactive oxygen species. *Antioxidants and Redox Signaling*. 5: 43–53. DOI:10.1089/152308603321223531
- Jordano P., Herrera C.M. (1981). The frugivorous diet of Blackcup populations *Sylvia atricapilla*, wintering in Southern Spain. *Ibis* 123: 502–507. DOI: 10.1111/j.1474-919X.1981.tb04055.x
- Kagan V.E., Fabisiak J.P., Quinn P.J. (2000). Coenzyme Q and vitamin E need each other as antioxidants. *Protoplasma*. 214: 11-18. DOI:10.1007/BF02524257
- Kaiser W.M. (1979). Reversible inhibition of the calvin cycle and activation of oxidative pentose phosphate cycle in isolated intact chloroplasts by hydrogen peroxide. *Planta*. 145:377-382. DOI:/10.1007/BF00388364
- Kan J., Wang H.M., Jin C-H., Xie H-Y. (2010) Changes of Reactive Oxygen Species and Related Enzymes in Mitochondria Respiratory Metabolism During the Ripening of Peach Fruit. *Agric. Sci. China*. 9: 138-146. [https://doi.org/10.1016/S1671-2927\(09\)60077-8](https://doi.org/10.1016/S1671-2927(09)60077-8).
- Kaniewski D., Van Campo E., Boiy T., Terral J.F., Khadari B., Besnard G. (2012). Primary domestication and early uses of the emblematic olive tree: palaeobotanical, historical and molecular evidences from the middle east. *Biological Reviews*. 87: 885–899. DOI:10.1111/j.1469-185X.2012.00229.x
- Kapoor D., Sharma R., Handa N., Kaur H., Rattan A., Yadav P., Gautam V., Kaur R., Bhardawj R. (2015). Redox homeostasis in plants under abiotic stress: role of electron carriers, energy metabolism mediators and proteinaceous thiols. *Front. Environ. Sci.* 3, DOI: 10.3389/fenvs.2015.00013.
- Kasai H. (1997). Analysis of a form of oxidative DNA damage, 8- hydroxy-2'-deoxyguanosine, as a marker of cellular oxidative stress during carcinogenesis. *Mutation Research*. 387:147-163. DOI:10.1016/S1383-5742(97)00035-5

- Kasote D.M., Katyare S.S., Hegde M.V., Bae H. (2015). Significance of Antioxidant Potential of Plants and its Relevance to Therapeutic Applications. *International Journal of Biological Sciences*. 11: 982-991. DOI:10.7150/ijbs.12096
- Kim D., Jeong S.W., Lee C. Y. (2003). Antioxidant capacity of phenolic phytochemicals from various cultivars of plums. *Food Chemistry*. 81: 321-326. DOI:10.1016/S0308-8146(02)00423-5
- Kiritsakis, A. (1992). *El aceite de oliva*. Ed. A. Madrid Vicente Ediciones. Madrid. ISBN 9788487440281
- Korkina LG, Afanas'ev I.B. (1997). Antioxidant and chelating properties of flavonoids. *Adv. Pharmacol.* 38: 151-163. DOI:10.1016/S1054-3589(08)60983-7
- Krieger-Liszkay A., Fufezan C., Trebst A. (2008). Singlet oxygen production in photosystem II and related protection mechanism. *Photosynthesis Research*. 98:551-564. DOI:10.1007/s11120-008-9349-3
- Kuehn G.D., Phillips G.C. (2005). Role of polyamines in apoptosis and other recent advances in plant polyamines. *Crit. Rev. Plant Sci.* 24:123–13. DOI:10.1080/07352680590953161
- Kumar N., Ebel R.C., Roberts P.D. (2011). H₂O₂ degradation is suppressed in kumquat leaves infected with *Xanthomonas axonopodis* pv. *Citri*. *Sci. Hortic.* 130: 241-247. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2011.07.005>
- Lebeau R. (1991). *Les grands types de structures agraires dans le monde*. Masson. Paris. 5^a edition
- Leegood R.C., Walker D.A. (1982). Regulation of fructose-1,6- bisphosphatase activity in leaves. *Planta.*, 156:449-456. DOI:10.1007/BF00393316
- Liu T., Van Staden J., Cress W.A. (2000). Salinity induced nuclear and DNA degradation in meristematic cells of soybean (*Glycine max* (L.)) roots. *Plant Growth Regulation*. 30: 49–54. DOI:10.1023/A:100631161
- Llerena J.L., Garrido I. (2010) *El olivar y sus industrias de transformación*. Anuario Caja de Badajoz. I.S.B.N.: 978-84-889-5699-1
- Loumou A. (1994). *The Contribution of the Part-Time Holdings in the Economic and Social Development Compared with the Full-Time Holdings – The Case of Beotia*. Ph.D. Thesis, Department of Agronomy, Aristotelian University of Thessaloniki, Thessaloniki, Greece

- Luchetti F. (1993). The international olive oil trade. *Olivae* 45: 16–18
- Lumaret R, Ouazzani N. 2001 Ancient wild olives in mediterranean forests. *Nature* 413, 700. DOI:10.1038/35099680
- Maheshwari R., Dubey R.S. (2009). Nickel-induced oxidative stress and the role of antioxidant defence in rice seedlings. *Plant Growth Regulation*. 59: 37-49. DOI: 10.1007/s10725-009-9386-8
- Mallick N., Mohn F.H. (2000). Reactive oxygen species: response of algal cells. *Journal of Plant Physiology*. 157: 183-193. DOI:10.1016/S0176-1617(00)80189-3
- Margaris N.S. (1988). Agriculture and Environment in the Department of Lesvos, Mytilini, Greece. University of the Aegean
- Margaris N.S., Mardiris T., Chairopoulos G. (1988). The 'retreat' of olive groves-forest. *Proceedings of Scientific Meeting, The Aegean Olive Groves, February 25–27 (pp. 18–25). Mytilini, Greece: Edition Elaiourgiki*
- Mariotti R., Cultrera N.G.M., Muñoz Díez C., Baldoni L., Rubini A. (2010). Identification of new polymorphic regions and differentiation of cultivated olives (*Olea europaea* L.) through plastome sequence comparison. *BMC Plant Biol*. 10:211. DOI: 10.1186/1471-2229-10-211
- Martínez-González M.A, Dominguez L.J., Delgado-Rodríguez M. (2014). Olive oil consumption and risk of CHD and/or stroke: a meta-analysis of case-control, cohort and intervention studies. *The British Journal of Nutrition* 112.2: 248-259. DOI: 10.1017/S0007114514000713
- Medina-Hernández E.J. (2015). Análisis Multivariante del Uso del Tiempo de la Población Colombiana Mediante el HJ Biplot y el Análisis Triádico Parcial. Trabajo de Fin de Máster, Universidad de Salamanca
- Meriga B., Reddy B.K., Rao K.R., Reddy L.A., Kishor P.B.K. (2004). Aluminium-induced production of oxygen radicals, lipid peroxidation and DNA damage in seedlings of rice (*Oryza sativa*). *Journal of Plant Physiology*. 161: 63-68. DOI:10.1078/0176-1617-01156
- Mhamdi A., Queval G., Chaouch S., Vanderauwera S., Van Breusegem F., Noctor G. (2010). Catalase function in plants: a focus on Arabidopsis mutants as

- stress-mimic models. *Journal of Experimental Botany*. 61: 4197-4220. DOI:10.1093/jxb/erq282
- Michalak A. (2006). Phenolic compounds and their antioxidant activity in plants growing under heavy metal stress. *Polish Journal of Environmental Studies*. 15: 523-530
 - Mishra H. P., Fridovich I. (1972). The univalent reduction of oxygen by reduced flavins and quinines. *Journal of Biological Chemistry*. 247: 188–192
 - Mishra S., Jha A.B., Dubey R.S. (2011). Arsenite treatment induces oxidative stress, upregulates antioxidant system, and causes phytochelatin synthesis in rice seedlings. *Protoplasma*. 248: 565-577. DOI: 10.1007/s00709-010-0210-0
 - Ron Mittler. (2017). ROS Are Good. *Trends in Plant Science*, Volume 22, Issue 1, Pages 11-19, ISSN 1360-1385,
 - Mittler R. (2002). Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. *Trends in Plant Science* 7: 405-410. DOI:10.1016/S1360-1385(02)02312-9
 - Mittler R., Vanderauwera S., Gollery M., Van Breusegem F. (2004). The reactive oxygen gene network in plants. *Trends Plant Sci.* 9: 490-498. DOI: 10.1016/j.tplants.2004.08.009
 - Mittler R., Zilinskas B.A. (1991). Purification and characterization of pea cytosolic ascorbate peroxidase. *Plant Physiology*. 97: 962-968. DOI: 10.1104/pp.97.3.962
 - Moller I.M., Jensen P.E., Hansson A. (2007). Oxidative modifications to cellular components in plants. *Ann. Rev. Plant Biol.* 58:459-481. DOI: 10.1146/annurev.arplant.58.032806.103946
 - Moller I.M., Kristensen B.K. (2004). Protein oxidation in plant mitochondria as a stress indicator. *Photochemical and Photobiological Sciences*. 3: 730-735. DOI:10.1039/b315561g
 - Montaña A. (2016). Medida de diferentes parámetros físico-químicos de aceitunas y aceites vírgenes de las variedades principales, cultivadas en Extremadura y desarrollo de técnicas elaiotécnicas para la mejora de la comercialidad de los aceites de oliva vírgenes. Tesis Doctoral. Universidad de Extremadura.

- Montealegre C., Alegre M. L. M., Garcia-Ruiz C. (2010). Traceability markers to the botanical origin in olive oils. *J. Agric. Food Chem.* 58: 28–38. <https://doi.org/10.1021/jf902619z> PMID: 19961225
- Morelló J.R., Vuorela S., Romero M.P., Motilva M.J., Heinonen M. (2005). Antioxidant activity of olive pulp and olive oil phenolic compounds of the Arbequina cultivar. *J. Agric. Food Chem.* 53: 2002–2008. <https://doi.org/10.1021/jf048386a> PMID: 15769127
- Moucheshi A.S., Pakniyat H., Pirasteh-Anosheh H., Azooz M.M (2014). Role of ROS as Signaling Molecules in Plants. In oxidative damage to plants; antioxidant networks and signalings, 1th Edition. P. Ahmad (ed.). S.P. College, Srinagara Jammu and Kashmir, India.pp: 585-620 DOI:10.1016/B978-0-12-799963-0.00020-4
- Moussa H.R., Abdel-Aziz S.M. (2008). Comparative response of drought tolerant and drought sensitive maize genotypes to water stress. *Australian Journal of Crop Sciences.* 1: 31-36
- Muñoz C., Trujillo I., Martínez-Urdiroz N., Barranco D., Rallo L., Marfil P., Gaut B.S. (2015) Olive domestication and diversification in the Mediterranean Basin. *New Phytologist* 206: 436-447. DOI: 10.1111/nph.13181
- Muñoz-Cobo J. (1990). Evolucion de la avifauna nidificante en olivares viejos de Jaen. *Testudo* 1: 99–117
- Neill S., Desikan R., Hancock J. (2002). Hydrogen peroxide signalling, *Current Opinion in Plant Biology.* 5:388-395. DOI: 1369-5266/02/\$
- Ngo T.T., Lenhoff H.M. (1980). A sensitive and versatile chromogenic assay for peroxidase and peroxidase-coupled reactions. *Analytical Biochemistry.* 195: 389–397. DOI:10.1016/0003-2697(80)90475-3
- Niethammer G. (1966). Vogelwelt Kretas im Winter. *Anzeiger der Ornithologischen Gesellschaft Bayeres* 7 (Sonderheft): 726–731
- Noctor G., Foyer C.H. (1998). Ascorbate and glutathione: keeping active oxygen under control. *Annual Review of Plant Biology.* 49: 249-279. DOI: /10.1146/annrev.arplant.49.1.249

- Noctor G., Foyer C.H. (2016). Intracellular redox compartmentation and ROS-related communication in regulation and signaling. *Plant Physiol.* 171: 1581–1592. DOI:10.1104/pp.16.00346
- Ocakoglu D., Tokatli F., Ozen B., Korel F. (2009). Distribution of simple phenols, phenolic acids and flavonoids in Turkish monovarietal extra virgin olive oils for two harvest years. *Food Chem* 113: 401–410. DOI:10.1016/j.foodchem.2008.07.057
- Oikonomidou, E. (1969). *Geobotanic Research of Skiathos Island*. Athens, Greece: Athens Library of Educational Society.
- Ortega-García F., Blanco S., Peinado M.A., Peragón J. (2008). Polyphenol oxidase and its relationship with oleuropein concentration in fruits and leaves of olive (*Olea europaea*) cv. 'Picual' trees during fruit ripening. *Tree Physiol.* 28: 45–54. PMID: 17938113
- Ortega-García F., Peragón J. (2009). Phenylalanine Ammonia-Lyase, Polyphenol Oxidase, and Phenol Concentration in Fruits of *Olea europaea* L. cv. Picual, Verdial, Arbequina, and Frantoio during Ripening. *J. Agr. Food Chem.* 57: 10331–10340. <https://doi.org/10.1021/jf901471c> PMID: 19813730
- Ozgur R., Turkan I., Uzilday B., Sekmen A.H. (2014). Endoplasmic reticulum stress triggers ROS signalling, changes the redox state, and regulates the antioxidant defence of *Arabidopsis thaliana*. *Journal of Experimental Botany* 65: 1377–1390. DOI: 10.1093/jxb/eru034
- Pandey P., Singh J., Achary V.M.M., Reddy M.K. (2015). Redox homeostasis via gene families of ascorbate-glutathione pathway. *Front. Environ. Sci.* 3:25. DOI: 10.3389/fenvs.2015.00025
- Patterson W.R., Poulos T.L. (1995). Crystal structure of recombinant pea cytosolic ascorbate peroxidase. *Biochemistry* 34: 4331-4341. DOI: 10.1021/bi00013a023
- Pinto E., Sigaud-Kutner T.C.S., Leitao M.A.S., Okamoto O.K., Morse D., Colepicolo P. (2003). Heavy metal-induced oxidative stress in algae. *Journal of Phycology.* 39: 1008-1018. DOI: /10.1111/j.0022-3646.2003.02-193.x
- Polese, J.M. (2009). *Cultivo de olivos*. Ediciones Omega, S.A. pp 96. Barcelona

- Polunin O., Huxley A. (1987). *Flowers of the Mediterranean*. London: Chatto and Windus
- Pritchard J.K., Stephens M., Donnelly P. (2000). Inference of population structure using multilocus genotype data. *Genetics*. 155, n 2: 945-959
- Racchi M., Bagnoli F., Balla I., Danti S. (2001). Differential activity of catalase and superoxide dismutase in seedlings and in vitro micropropagated oak (*Quercus robur* L.). *Plant Cell Reports* 20: 169-174. DOI:10.1007/s002990000300
- Radyuk M.S., Domanskaya I.N., Shcherbakov R.A., Shalygo N.V. (2009). Effect of low above-zero temperature on the content of low-molecular antioxidants and activities of antioxidant enzymes in green barley leaves. *Russian Journal of Plant Physiology*. 56: 175-180. DOI:10.1134/S1021443709020058
- Rallo L, Barranco D, Caballero JM, Del Rio C et al. (2005). *Variedades de Olivo en España*. Junta de Andalucía. MAPA y Ediciones Mundi-Prensa, Madrid
- Rhoads D.M., Umbach A.L., Subbaiah C.C., Siedow J.N. (2006). Mitochondrial reactive oxygen species. Contribution to oxidative stress and interanellar signaling. *Plant Physiol* 141: 357e366. DOI: 10.1104/pp.106.079129
- Rice-Evans C.A. (2000). Measurement of total antioxidant activity as a marker of antioxidant status in vivo: procedures and limitations. *Free Radical Biology and Medicine*. 33: 559-566
- Richter C. (1992). Reactive oxygen and DNA damage in mitochondria. *Mutation Research, DNAging Genetic Instability and Aging*. 275: 249–255. DOI:10.1016/0921-8734(92)90029-O
- Rigo A., Stevanato R., Finazzi-Agro A., Rotilio G. (1977). An attempt to evaluate the rate of the Haber Weiss reaction by using •OH radical scavengers. *FEBS Letters*. 80:130-132. DOI:10.1016/0014-5793(77)80422-5
- Riley F.R. (2002) *Olive oil production on Bronze Age Crete: Nutritional properties, processing methods and storage life of Minoan olive oil*, *Oxford J. Archaeol*. 21: 63-75. DOI:10.1111/1468-0092.00149
- Rivero R.M., Ruíz J.M., García P.C., López-Lefebvre L.R., Sánchez E., Romero L., (2001). Resistance to cold and heat stress: accumulation of phenolic compounds

- in tomato and watermelon plants. *Plant Science*. 160: 315-321. DOI:10.1016/S0168-9452(00)00395-2
- Rodríguez-Ariza M.O., Montes E. (2005). On the origin and domestication of *Olea europaea* L. (olive) in Andalucía, Spain, based on the biogeographical distribution of its finds. *Vegetation History and Archaeobotany* 14: 551–561. DOI:10.1007/s00334-005-0012-z
 - Romero L.R. (1998). Olive farming in the age of science and innovation. *Olivae* 72: 42–51
 - Romero-Puertas M.C., Palma J.M., Gómez M., Del Río L.A., Sandalio L.M. (2002). Cadmium causes the oxidative modification of proteins in pea plants. *Plant Cell and Environment*. 25: 677-686. DOI:10.1046/j.1365-3040.2002.00850.x
 - Rubinstein B., Stem A.I., Stout R.G. (1984). Redox activity at the surface of oat root cells. *Plant Physiology* 76: 386-391
 - Rubio R., Balaguer L., Manrique E., Pérez M.E., Vargas P. (2002). On the historical presence of the wild olive [*Olea europaea* L. var. *sylvestris* (Miller) Lehr. (Oleaceae)] in the Eurosiberian region of the Iberian Peninsula. *Anales del Jardín Botánico de Madrid* 59 (2), 342–344. ISSN: 0211-1322
 - Rukmini M.S., D’Souza B., D’Souza V. (2004). Superoxide dismutase and catalase activities and their correlation with malondialdehyde in schizophrenic patients. *Indian Journal of Clinical Biochemistry* 19, 114-118. DOI: 10.1007/BF02894268
 - Sagi M., Fluhr R. (2006). Production of Reactive Oxygen Species by Plant NADPH Oxidases. *Plant Physiology*. 141:336-341. DOI: /10.1104/pp.106.078089
 - Sansoucy R, Alibes X., Berge P., Martilotti F., Nefzaoui A., Zoïopoulos P. (1985) Los subproductos del olivar en la alimentación animal en la cuenca del Mediterráneo. *Estudio FAO: Producción y Sanidad Animal* 43. ISBN 92-5-301488-1
 - Sanz-Cortéz F, Badenes ML, Paz S, Íñiguez A, et al. (2001). Molecular characterization of olive cultivars using RAPD markers. *J. Am. Soc. Hort. Sci.* 126: 7-12
 - Scandalios J.G. (1993). Oxygen stress and superoxide dismutases. *Plant Physiology*. 101: 7-12. DOI:10.1104/pp.101.1.7

- Scandalios J.G., Guan L., Polidoros A.N. (1997). Catalases in plants: gene structure, properties, regulation and expression. *Journal of Botany* 23 in *Oxidative Stress and the Molecular Biology of Antioxidants Defenses*, J. G. Scandalios, Ed., pp. 343–406, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, NY, USA. DOI: 10.1101/087969502.34.343
- Semchuk N.M., Lushchak O.V., Falk J., Krupinska K., Lushchak V.I. (2009). Inactivation of genes, encoding tocopherol biosynthetic pathway enzymes, results in oxidative stress in outdoor grown *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiology and Biochemistry*. 47: 384-390. DOI:/10.1016/j.plaphy.2009.01.009
- Sereni E. (1964). *Histoire du paysage rurale Italien*. Paris: Julliard; Lebeau, R. (1991). *Les grandes types de structures agraires dans le monde*, 5th edn. Paris: Masson
- Sgherri, C. , Cosi, E. and Navari-Izzo, F. (2003), Phenols and antioxidative status of *Raphanus sativus* grown in copper excess. *Physiologia Plantarum*, 118: 21-28.
- Shah K., Kumar R.G., Verma S., Dubey R.S. (2001) Effect of cadmium on lipid peroxidation, superoxide anion generation and activities of antioxidant enzymes in growing rice seedlings, *Plant Science*, 161: 1135–1144. DOI:10.1016/S0168-9452(01)00517-9
- Shao H.B., Chu L.Y., Lu Z.H., Kang C.M. (2008). Primary antioxidant free radical scavenging and redox signaling pathways in higher plant cells. *International Journal of Biological Sciences*. 4: 8-14. DOI:10.7150/ijbs.4.8
- Sharma P., Dubey R.S. (2005). Drought induces oxidative stress and enhances the activities of antioxidant enzymes in growing rice seedlings. *Plant Growth Regulation*. 46: 209–221. DOI:10.1007/s10725-005-0002-2
- Sharma P., Dubey R.S. (2007). Involvement of oxidative stress and role of antioxidative defense system in growing rice seedlings exposed to toxic concentrations of aluminum. *Plant Cell Reports*. 26: 2027-2038. DOI: 10.1007/s00299-007-0416-6
- Sharma P., Jha A.B., Dubey R.S., Pessarakli M. (2012) Reactive Oxygen Species, Oxidative Damage, and Antioxidative Defense Mechanism in Plants under Stressful Conditions. *Journal of Botany* Volume 2012, Article ID 217037, 26 pages DOI:10.1155/2012/217037

- Sifnaiou E. (1996). Lesvos, Economic and Social History (1840–1912). Athens, Greece: Edition Trochalia
- Smirnoff N. (2000). Ascorbic acid: metabolism and functions of a multi-faceted molecule. *Current Opinion in Plant Biology*. 3: 229-235. DOI:10.1016/S1369-5266(00)80070-9
- Smirnoff N., Running J.A., Gatzek S. (2004). Ascorbate biosynthesis: a diversity of pathways. in *Vitamin C: Its Functions and Biochemistry in Animals and Plants*. H. Asard, J.M.May, and N. Smirnoff, Eds., pp. 7–29, BIOS Scientific, New York, NY, USA. DOI:10.1016/j.freeradbiomed.2018.03.033
- Sobhy El Sohaimy A.A., Mohamed El-Sheikh H., Taha Refaay M., Mohamed Zaytoun A.M. (2016). Effect of Harvesting in Different Ripening Stages on Olive (*Olea europaea*) Oil Quality. *Am. J. Food Tech.* 11: 1-11. <https://doi.org/10.3923/ajft.2016.1.11>
- Sofo A., Benjeddou H., Fourati R., Ben Ahmed C., Ben Rouina B., Galgano F., Caruso M.C., Casacchia T., Scorpa A. (2018). Characterization of biochemical factors affecting crop load in three olive cultivars. *Eur. J. Hort. Sci.* 83: 28–34. <https://doi.org/10.17660/eJHS2018/83.1.4>.
- Sofo A., Dichio B., Xiloyannis C. & Masia A. (2004a). Antioxidant defences in olive tree during drought stress: changes in activity of some antioxidant enzymes. *Functional Plant Biology* 32, 45– 53. DOI:10.1071/FP04003
- Sofo A., Dichio B., Xiloyannis C. & Masia A. (2004b). Lipxygenase activity and proline accumulation in leaves and roots of olive trees in response to drought stress. *Physiologia Plantarum* 121, 58–65. DOI: 10.1111/j.0031-9317.2004.00294.x
- Soleri D., Koehmstedt A., Aradhya M. K, Polito V., Pinney K. (2007). Comparing the historic olive trees (*Olea europaea* L.) of Santa Cruz Island with contemporaneous trees in the Santa Barbara, CA area: a case study of diversity and structure in an introduced agricultural species conserved in situ *Genet Resour Crop Evol.* DOI: 10.1007/s10722-010-9537-9
- Srivastava S., Dubey R.S. (2011). Manganese-excess induces oxidative stress, lowers the pool of antioxidants and elevates activities of key antioxidative

- enzymes in rice seedlings. *Plant Growth Regulation*. 64: 1-16. DOI: 10.1007/s10725-010-9526-1
- Suarez F., Muñoz-Cobo J. (1984). Las comunidades de aves invernantes en cuatro medios diferentes de la provincia de Cordoba. *Doñana Acta Vertebrata* 11: 45–63
 - Tanou G., Molassiotis A., Diamantidis G. (2009). Induction of reactive oxygen species and necrotic death-like destruction in strawberry leaves by salinity. *Environmental and Experimental Botany*. 65: 270-281. DOI: 10.1016/j.envexpbot.2008.09.005
 - Tausz M., H. Sircelj H., Grill D. (2004). The glutathione system as a stress marker in plant ecophysiology: is a stress-response concept valid? *Journal of Experimental Botany*. 55: 1955-1962. DOI:10.1093/jxb/erh194
 - Taylor K.C. (1997). The Holocene-Younger Dryas transition recorded at Summit, Greenland. *Science* 278: 825-827. DOI: 10.1126/science.278.5339.825
 - Terral J.F., Newton C., Durand A., Bouby L., Ivorra S. (2012) Les origines de la culture et l’histoire de la domestication de l’olivier (*Olea europaea* L.) en Méditerranée nord occidentale au révélateur de l’archéobiologie. In *L’Olivier l’arbre des temps* Eds C Breton & A. Bervillé, Quae, Versailles.
 - Thipyapong P., Hunt M.D., Steffens J.C. (1995). Systemic wound induction of potato (*Solanum tuberosum*) polyphenol oxidase. *Phytochemistry*. 40: 673-676. DOI:10.1016/0031-9422(95)00359-F
 - Torres M.A., Dangl J.L., Jones J.D.G. (2002). Arabidopsis gp91phox homologues AtrbohD and AtrbohF are required for accumulation of reactive oxygen intermediates in the plant defense response. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 99: 517-522. DOI:10.1073/pnas.012452499
 - Trchounian A., Petrosyan M., Sahakyan N. (2016). Plant Cell Redox Homeostasis and Reactive Oxygen Species. in: *Redox State as a Central Regulator of Plant-Cell Stress Responses*. Gupta, Dharmendra Kumar, Palma , Jose M., Corpas , Francisco J. (Eds). Springer International Publishing Switzerland. pp:25-50. DOI: 10.1007/978-3-319-44081-1_2

- Trujillo I, Ojeda MA, Urdiroz NM, Potter D, Barranco D, Rallo L, Diez CM. (2014). Identification of the Worldwide Olive Germplasm Bank of Córdoba (Spain) using SSR and morphological markers. *Tree Genetics & Genomes* 10: 141–155. DOI:10.1007/s11295-013-0671-3
- Tura, D., Gigliotti, C., Pedo, S., Failla, O., Bassi, D., & Serraiocco, A. (2007). Influence of cultivar and site of cultivation on levels of lipophilic and hydrophilic antioxidants in virgin olive oils (*Olea Europea* L.) and correlations with oxidative stability. *Scientia Horticulturae*, 112, 108–119. DOI:10.1016/j.scienta.2006.12.036
- Tzedakis P.C., Lawson I.T., Frogley M.R., Hewitt G.M., Preece R.C. (2002). Buffered Tree Population Changes in a Quaternary Refugium: Evolutionary Implications. *Science*. 297, 2044-2047. DOI: 10.1126/science.1073083
- Uceda, M., Aguilera, M.P, Beltrán, G., Jiménez, A. (2008). Variedades de olivo y aceituna. Tipos de aceites. Capítulo 4. Ed. L. R. Cuellar, Madrid, España
- Ushimaru T., Maki Y., Sano S., Koshiba K., Asada K., Tsuji H. (1997). Induction of Enzymes Involved in the Ascorbate-Dependent Antioxidative System, Namely, Ascorbate Peroxidase, Monodehydroascorbate Reductase and Dehydroascorbate Reductase, after Exposure to Air of Rice (*Oryza sativa*) Seedlings Germinated under Water. *Plant and Cell Physiology*. 38: 541-549. DOI:10.1093/oxfordjournals.pcp.a029203
- Valko M., Morris H., Cronin M.T.D. (2005). Metals, toxicity and oxidative stress. *Current Medicinal Chemistry*. 12: 1161-1208. DOI:10.2174/0929867053764635
- Verma S., Dubey R.S. (2003). Lead toxicity induces lipid peroxidation and alters the activities of antioxidant enzymes in growing rice plants. *Plant Science*. 164: 645- 655. DOI:10.1016/S0168-9452(03)00022-0
- Vicente Galindo P. (2013). Análisis de tablas de tres vías: recientes desarrollos del STATIS, Trabajo de Fin de Máster. Universidad de Salamanca
- Vokou D. (1988). The olive groves as natural ecosystems. *Proceedings of Scientific Meeting, The Aegean Olive Groves, February 25–27* (pp. 5–17). Mytilini, Greece: Edition Elaiourgiki
- Voothuluru P., Sharp R.E. (2013) Apoplastic hydrogen peroxide in the growth zone of the maize primary root under water stress. I. Increased levels are

- specific to the apical region of growth maintenance. *J. Exp. Bot.* 64: 1223–1233. DOI: 10.1093/jxb/ers277
- Vossen P. 2007. Olive oil: history, production, and characteristics of the world's classic oils. *HortScience* 42: 1093–1100.
 - VVAA, Catálogo Mundial de Variedades de Olivo. CONSEJO OLEICOLA INTERNACIONAL 2000, ISBN: 9788493166335
 - Wagner, D. Przybyla D., Op Den Camp R., Kim C., Landgraf F., Lee K.P., Würsch M., Laloi C., Nater M., Hideg E., Apel K. (2004). The genetic basis of singlet oxygen-induced stress response of *Arabidopsis thaliana*. *Science*. 306:1183-1185. DOI: 10.1126/science.1103178
 - Wang J., Zhang H., Allen R.D. (1999). Overexpression of an *Arabidopsis* peroxisomal ascorbate peroxidase gene in tobacco increases protection against oxidative stress. *Plant and Cell Physiology*. 40: 725-732. DOI:/10.1093/oxfordjournals.pcp.a029599
 - Warren A. (1986). Productivity, variability and sustainability as criteria of desertification in Europe. In R. Fantechi and N. S. Margaris (eds.), *Desertification in Europe* (pp. 83–94). Boston: D. Reidel Publishing Company. DOI:10.1007/978-94-009-4648-4_8
 - Waskiewicz A., Beszterda M., Golinski P. (2014). Nonenzymatic antioxidants in plants. In *oxidative damage to plants; antioxidant networks and signalings*, 1th Edition. P. Ahmad (ed.). S.P. College, Srinagara Jammu and Kashmir, India.pp: 201-234 DOI:10.1016/B978-0-12-799963-0.00007-1
 - Welinder K.G. (1992). Superfamily of plant, fungal and bacterial peroxidases. *Current Opinion in Structural Biology*. 2: 388-393. DOI:10.1016/0959-440X(92)90230-5
 - Willekens H., Inze D., Van Montagu M., Van Camp W. (1995). Catalases in plants. *Molecular Breeding*, 1: 207-228. DOI:10.1007/BF02277422
 - Yamaguchi-Shinozaki K., Shinozaki K. (1994). A novel cis element in an *Arabidopsis* gene is involved in responsiveness to drought, low-temperature, or high-salt stress. *Plant Cell*. 6: 251–264, 1994. DOI:10.1105/tpc.6.2.251
 - Yamauchi Y., Furutera A., Seki K., Toyoda Y., Tanaka K., Sugimoto Y. (2008). Malondialdehyde generated from peroxidized linolenic acid causes protein

- modification in heat-stressed plants. *Plant Physiology and Biochemistry*. 46: 786–793. DOI:10.1016/j.plaphy.2008.04.018
- Yan J., Tsuichihara N., Etoh T., Iwai S. (2007). Reactive oxygen species and nitric oxide are involved in ABA inhibition of stomatal opening. *Plant, Cell and Environment*. 30:1320-1325. DOI: 10.1111/j.1365-3040.2007.01711.x
 - Yemm E.W., Coking E.C. (1955). The Determination of Amino-acids with Ninhydrin. *Analyst*. 80: 209-213. DOI:10.1039/AN9558000209
 - Yoruk B, Taskin V. (2014). Genetic diversity and relationships of wild and cultivated olives in Turkey. *Plant Systematics and Evolution* 300: 1247–1258. DOI:10.1007/s00606-014-1002-3
 - Young A.J. (1991). The photoprotective role of carotenoids in higher plants. *Physiologia Plantarum*. 83: 702-708. DOI:10.1111/j.1399-3054.1991.tb02490.x
 - Zamora R., Alaiz M., Hidalgo F.J. (2001) Influence of cultivar and fruit ripening on olive (*Olea europaea*) fruit protein content, composition, and antioxidant activity. *J. Agric. Food Chem.* 49: 4267–4270. PMID: 11559121
 - Zeder M.A., Emswiller E., Smith B.D., Bradley D.G. (2006). Documenting Domestication, the intersection of genetics and archaeology. *Trends in genetics*, 22: 139-155. DOI:10.1016/j.tig.2006.01.007
 - Zohary D, Hopf M, Weiss E. (2012). *Domestication of plants in the Old World: The origin and spread of cultivated plants in Southwest Asia, Europe, and the Mediterranean basin*. Oxford, UK: Oxford University Press.
 - Zohary D., Spiegel-Roy P. (1975). Beginnings of fruit growing in the Old World. *Science* 187: 319–327. DOI: 10.1126/science.187.4174.319

Enlaces Web:

- FAO. 2012. The statistical database (FAOSTAT). [WWW document] URL
- <https://www.aceitesdeolivadeespana.com/la-importancia-de-las-variedades>
- https://www.biotek.com/assets/tech_resources/10592a/figure1.jpg

Índice

RESUMEN	1
ABSTRACT	3
INTRODUCCIÓN	5
1.- EL OLIVO	7
1.1.- ORIGEN DEL OLIVO	7
1.2.- MIGRACIÓN HISTÓRICA DEL OLIVO	9
1.3.- DOMESTICACIÓN DEL OLIVO	11
1.4.- LA VARIABILIDAD GENÉTICA DEL OLIVO	17
1.5.- CARACTERÍSTICAS DEL OLIVO Y LA ACEITUNA	19
1.6.- VARIEDADES DE OLIVO	20
1.7.- EL ACEITE DE OLIVA	26
1.8.- IMPORTANCIA ECOLÓGICA DEL OLIVO	28
1.9.- IMPORTANCIA ECONÓMICA Y AMBIENTAL DEL OLIVO	30
2. MECANISMO DE DEFENSA EN PLANTAS. PRODUCCIÓN DE ESPECIES REACTIVAS DEL OXÍGENO (ROS).	35
2.1.- ESPECIES REACTIVAS DEL OXÍGENO (ROS)	35
2.2. PRINCIPALES FUENTES DE ROS RELACIONADAS CON LAS REACCIONES DE DEFENSA	40
2.3. SISTEMAS ANTIOXIDANTES EN PLANTAS	44
2.4. LAS ROS Y EL DAÑO OXIDATIVO A LAS BIOMOLÉCULAS.	52
OBJETIVO	57
MATERIAL Y MÉTODOS	61
1.- MATERIAL VEGETAL	63
2.- DETERMINACIÓN DEL PESO SECO, CONTENIDO EN AMINOÁCIDOS	66
	193

SOLUBLES Y PROTEÍNAS	
3.- MEDIDA DE ACTIVIDADES ENZIMÁTICAS	68
4.- ANÁLISIS BIOQUÍMICOS DE COMPONENTES FENÓLICOS	70
5.- MEDIDA DE ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE TOTAL: ENSAYO FRAP (FERRIC REDUCING ABILITY OF PLASMA)	71
6.- ANÁLISIS ESTADÍSTICO	72
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	79
1.- OBTENCIÓN DE DATOS DIRECTOS	81
2.- RELACIÓN PESO SECO/PESO FRESCO, AMINOÁCIDOS SOLUBLES Y PROTEÍNAS TOTALES	88
3. OXIDACIÓN NADH Y PRODUCCIÓN DE O ₂ .-	99
4. ACTIVIDADES ENZIMÁTICAS ANTIOXIDANTES: SOD Y POD	108
5. COMPUESTOS FENÓLICOS TOTALES, FLAVONOIDES, FENILPROPANOIDES GLICÓSIDOS Y ACTIVIDAD PPO	116
6. CAPACIDAD ANTIOXIDANTE (FRAP)	132
7.- ANÁLISIS GLOBAL DEL EFECTO DE LOS FACTORES PRODUCTIVOS EN LA RESPUESTA DEL OLIVO MEDIANTE MDS-PTA	136
7.1.- COMPARACIÓN ENTRE MÉTODOS	136
7.2.- INDIVIDUOS COMPROMISO	141
7.3.- ANÁLISIS DE LAS VARIABLES	146
7.4.- ANÁLISIS DE LA EVOLUCIÓN (TRAYECTORIA) DE LAS VARIABLES EN LOS DIFERENTES AÑOS	154
CONCLUSIONES	159
BIBLIOGRAFÍA	163
ÍNDICE	193